

UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS



**REPERCUSSÕES CRÓNICAS NAS VIAS AÉREAS
DA HIPERÓXIA NEONATAL
Modelo Experimental**

TERESA GAMBOA

2007

**REPERCUSSÕES CRÓNICAS NAS VIAS AÉREAS
DA HIPERÓXIA NEONATAL
Modelo Experimental**

**TERESA GAMBOA
2007**

Dissertação de Doutoramento elaborada sob a orientação do Professor Doutor António Manuel Bensabat Rendas, Director do Departamento de Fisiopatologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa.

O presente trabalho foi realizado no Departamento de Fisiopatologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa, integrado no Centro de Estudos de Patologia Respiratória, financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia desde 2003.

Everything should be as simple as it is, but not simpler

Albert Einstein

(1879-1955)

AGRADECIMENTOS

Ao meu mestre, o Professor Doutor António Rendas. Sob a sua orientação, a elaboração deste trabalho foi uma vez mais uma oportunidade de aprendizagem e amadurecimento, científico e pessoal. O meu reconhecimento pela generosidade com que conseguiu encontrar o tempo, o entusiasmo e a paciência que tornaram possível a concretização de mais uma fase da minha formação.

Ao Professor Doutor Miguel Correia, pelo tempo que dedicou à avaliação morfológica qualitativa das repercussões da hiperóxia sobre a traqueia, cujos resultados em muito contribuíram para o enriquecimento deste estudo.

Ao Professor James Martin que, generosamente, disponibilizou os recursos técnicos e humanos necessários para a realização da análise morfométrica da área de músculo e pelo interesse com que, à distância, tem seguido a evolução do meu trabalho.

Ao Conselho Científico da Faculdade de Ciências Médicas de Lisboa, na pessoa da sua Presidente, a Professora Doutora Maria da Graça Morais, pelo apoio e confiança que depositou na conclusão deste trabalho.

A Professor Doutor Nuno Neuparth que, no domínio da avaliação funcional respiratória, abriu caminho à minha curiosidade pelos mecanismos da hiperreactividade brônquica e com quem tive oportunidade de discutir as implicações práticas dos resultados obtidos.

Ao Professor Doutor Pedro Costa, com quem contei sempre, “no departamento ao lado”, nas grandes e pequenas dúvidas. Pelas condições que, enquanto Director do Biotério da FCML e com a Professora Doutora Ana Isabel Santos, me foram oferecidas.

À Professora Doutora Maria Amália Botelho e á Dra. Patrícia Rosado Pinto (minha mestra das coisas pedagógicas), pelo companheirismo e solidariedade com que acompanharam todos os momentos de elaboração desta tese. A elas devo também a revisão do texto final.

À Dra Cristina Pereira, à Professora Doutora Alexandra Ribeiro e à Dra Paula João Faria pelo estímulo, confiança e presença permanentes, pelas críticas pertinentes e pelas revisões sucessivas das diferentes formas que este texto foi tendo.

À Isabel Ribeiro da Silva, pela disponibilidade com que sempre colaborou na realização do trabalho laboratorial e pelo rigor que colocou em todo o trabalho realizado.

Ao Dr Gonçalo Fernandes, companheiro de muitas horas de laboratório, pela disponibilidade e dedicação.

ÍNDICE

GLOSSÁRIO	11
RESUMO	13
ABSTRACT	14
INTRODUÇÃO	15-54
I. Exposição Pulmonar à Hiperóxia e Stress Oxidativo	17
1. Stress oxidativo e lesão pulmonar	17
2. Relação entre exposição a espécies reactivas de oxigénio (ROS) e stress oxidativo	19
3. Relação entre exposição à hiperóxia e a formação de ROS	22
4. Relação entre hiperóxia e a formação de espécies reactivas de azoto (RNS) ..	25
5. Relação entre as ROS e a resposta inflamatória induzida pela hiperóxia	26
II. A Exposição Pulmonar à Hiperóxia em Fases Precoces do Desenvolvimento – Contributo dos Modelos Animais	27
1. Exposição à hiperóxia, stress oxidativo e displasia broncopulmonar (DBP) ...	27
2. Alterações funcionais do músculo liso - hiperreactividade brônquica (HRB) ...	35
3. Contributo dos modelos animais para a compreensão dos mecanismos da HRB induzida pela hiperóxia	51
OBJECTIVO	55-58
MATERIAL e MÉTODOS	59-80
I. Animais	61
II. Equipamento para Exposição a Hiperóxia	62
III. Equipamento para Medição da Força Isométrica in vitro	65
IV. Soluções e Agentes Farmacológicos	67
V. Protocolo Experimental	67
1. Exposição de ratos Wistar a hiperóxia moderada	67
2. Grupos de controlo	69
3. Preparação do material de experiência	69
4. Medição da força isométrica	70
VI. Análise do Sinal – Força Isométrica	71
1. Critérios de análise	71
2. Estabilidade do sinal	72
3. Expressão dos resultados	73
VII. Métodos de Análise dos Resultados	74
VIII. Análise Morfométrica da Área de Músculo	77
IX. Histologia	78

RESULTADOS	81-113
I. Caracterização dos Grupos de Controlo	83
1. Avaliação da resposta à estimulação colinérgica nos grupos de controlo	83
2. Avaliação da resposta ao salbutamol nos grupos de controlo.....	84
II. Caracterização dos Grupos Experimentais.....	89
1. Sobrevivência e repercussões sobre o crescimento em machos e fêmeas.....	89
2. Avaliação da resposta à estimulação colinérgica e β_2 -adrenérgica – comparação entre machos e fêmeas	89
III. Avaliação das Repercussões da Exposição a 50%O ₂	93
1. Caracterização dos grupos e crescimento somático.....	93
2. Força isométrica basal.....	94
3. Resposta à estimulação colinérgica	95
4. Resposta à estimulação β_2 -adrenérgica.....	99
IV. Avaliação das Repercussões Morfológicas da Exposição Neonatal a 50% O ₂ .	104
1. Análise morfométrica do MLT	104
2. Histologia	106
DISCUSSÃO	115-144
I. Grupos de Controlo	119
1. Comparação da força isométrica entre machos e fêmeas – valores basais e das respostas à estimulação colinérgica e β_2 -adrenérgica	119
2. Avaliação Morfológica.....	127
II. Repercussões Crónicas da Exposição a 50%O ₂	128
1. Sobrevivência e repercussões sobre o crescimento somático.....	128
2. Comparação entre machos e fêmeas – respostas à estimulação colinérgica e β_2 - adrenérgica.....	128
3. Resposta à estimulação β_2 -adrenérgica.....	129
4. Resposta à estimulação colinérgica e correlações morfo-funcionais	132
CONCLUSÃO	145
BIBLIOGRAFIA	151-172

GLOSSÁRIO

$^1\text{O}_2$	Singuleto de oxigénio
5-HT	5-hidróxitriptamina
Ach	Acetilcolina
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ANOVA	Análise de variância
AP-1	Activador da proteína 1
ATP	Adenosina trifosfato
BCE	Bronquite crónica eosinofílica
CAT	Catalase
CDR	Curva dose-resposta
CXC	Quimiocinas quimiotáticas para os neutrófilos
DBP	Displasia broncopulmonar
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EC_{50%}	Concentração eficaz
ECSOD	Dismutase extracelular do superóxido
EC_{x%}/ED_{x%}	Concentração/dose eficaz
EFS	Estimulação eléctrica de alta frequência
E_L	Elastância pulmonar
E_{max}	Força isométrica máxima
EPO	Peroxidases do eosinófilo
F_{basal}	Força isométrica basal
FGF	Factor básico de crescimento dos fibroblastos
FiO₂	Fracção inspirada de oxigénio
F_{max%}	Aumento percentual da força isométrica relativa ao valor basal
F_{min%}	Percentagem de redução relativa á força isométrica máxima
G_i	Fracção inibidora da proteína G
GPx	Peroxidase do glutatião
G_{qa}	Subunidade <i>qa</i> da proteína G
G_s	Fracção <i>s</i> da proteína G
GSH/GSSG	Glutatião reduzido/glutatião oxidado
H₂O₂	Peróxido de hidrogénio
HO	Heme-oxigenase
HO⁻	Radical hidróxilo
HRB	Hiperreactividade brônquica
IC	Intervalo de confiança
ICAM	Moléculas de adesão intracelulares
IgE	Imunoglobulina E
IL	Interleucina
iNOS	Sintetase inductível do monóxido de azoto
LCT₄	Leucotrieno C4
LS/LI	Límite superior/límite inferior do intervalo de confiança
MAPK	Quinases activadas por mitogénios
MEC	Matriz extracelular
ML	Músculo liso
MLCK	Quinase das cadeias leves de miosina
MLT	Músculo liso da traqueia
MLVA	Músculo liso das vias aéreas
MMP	Metaloproteinase
MPO	Mieloperoxidase
NADP	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzida
NF-κB	Factor nuclear κB
NO	Monóxido de azoto
O₂^{-•}	Anião superóxido

PAR	Receptor activado por proteases
PGD₂	Prostaglandina D2
PGE₂	Prostaglandina E2
P_{MB}²	Perímetro da membrana basal do epitélio da traqueia
pO₂	Pressão parcial de oxigénio
R M₂	Receptor muscarínico M2
R M₃	Receptor muscarínico M3
R β₂	Receptor β ₂
R_L	Resistência pulmonar
RNS	Espécies reactivas de azoto
ROS	Espécies reactivas de oxigénio
SCF	Stem cell factor
SOD	Dismutase do superóxido
TGFβ	Factor de transformação e crescimento β
TIMP	Inibidores das metaloproteinases
TNFα	Factor de necrose tumoral α
TPx	Peroxidase da tiorredoxina
Trx	Tiorredoxina
VEGF	Factor vascular de crescimento endotelial

RESUMO

O objectivo deste trabalho foi avaliar se a exposição crónica neonatal à hiperóxia moderada induz alterações funcionais e estruturais persistentes nas vias aéreas.

Desenvolveu-se um modelo animal, no rato, a partir do qual se retiraram implicações para a compreensão das repercussões crónicas da hiperóxia neonatal sobre as vias aéreas de displasia broncopulmonar (DBP), em duas fases distintas: imediatamente após a exposição neonatal a 50%O₂ (grupo 50%O₂) e após três semanas de recuperação em ar ambiente (grupo 50%O₂+Ar).

Compararam-se os resultados da resposta do músculo liso de traqueia (MLT) à estimulação *in vitro* com metacolina e salbutamol e avaliaram-se as alterações quantitativas da área de MLT, bem como as alterações qualitativas da estrutura da traqueia.

Demonstrou-se que a exposição a 50% de oxigénio não tinha repercussões imediatas sobre a resposta *in vitro* do MLT à estimulação colinérgica, mas que induzia um aumento do relaxamento em resposta ao salbutamol. A contractilidade do MLT em resposta à estimulação com metacolina no grupo 50%O₂+Ar foi significativamente superior à do grupo de controlo da mesma idade e também superior à observada no grupo 50%O₂, enquanto que a resposta ao salbutamol se voltou a aproximar dos valores de controlo após a recuperação em normóxia.

Não se observaram diferenças estatisticamente significativas na área de MLT entre os grupos experimental e de controlo, o que se deve provavelmente ao número reduzido de amostras avaliadas e à variabilidade deste parâmetro no grupo de controlo; contudo, verificou-se um aumento médio de 15% imediatamente após a exposição à hiperóxia que persistiu após o período de recuperação.

As alterações qualitativas sobre a arquitectura da traqueia, avaliadas por microscopia óptica, revelaram no grupo 50%O₂ aumentos da espessura da matriz extracelular e da densidade de mastócitos desgranulados na submucosa e adventícia vizinhas do MLT, sem outras alterações relativamente ao grupo de controlo com 15 dias. As alterações da matriz extracelular foram reversíveis após a recuperação em ar ambiente. A densidade de mastócitos permaneceu superior à do grupo de controlo de 36 dias de idade, apresentando-se em maior contiguidade com o MLT relativamente ao grupo 50%O₂.

Em síntese, demonstrou-se que a hiperóxia neonatal crónica em níveis moderados induz alterações da resposta contráctil do MLT e da estrutura da traqueia que podem ter expressão funcional após a exposição ter cessado. Assim, o contributo original do presente trabalho foi o desenvolvimento de um modelo animal que permite avaliar os mecanismos pelos quais a hiperóxia é capaz de induzir, isoladamente, **alterações crónicas** da contractilidade, do relaxamento do ML e da estrutura das vias aéreas que podem ser responsáveis pela HRB persistente em doentes sujeitos a oxigenioterapia neonatal.

ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate whether chronic neonatal exposure to hyperoxia induces persistent structural and functional airway changes.

An animal model was developed, using neonatal rats, in order to understand the chronic effects of neonatal hyperoxia on the airways, in bronchopulmonary dysplasia, in two distinct phases: immediately after neonatal exposure to 50%O₂ (50%O₂ group) and after three weeks of recovery at ambient air (50%O₂+Ar group).

The results from the tracheal smooth muscle (TSM) response to *in vitro* stimulation with metacholine and salbutamol were compared and quantitative changes in TSM area, as well as qualitative changes in tracheal structure were evaluated.

It was demonstrated that while exposure to 50% oxygen had no immediate effects on *in vitro* TSM response to cholinergic stimulation, it induced an increase in relaxation as a result of salbutamol administration. TSM contractility as a result of methacholine administration in the 50%O₂ + Ar group was significantly higher than that of the same-age control group, and also higher than the one observed in the 50%O₂ group, whereas the response to salbutamol administration was once again closer to the control values after recovery in normoxia.

There were no statistically significant differences in the TSM area between the experimental and control groups, which is most likely due to the reduced number of samples evaluated and to the variability of this parameter in the control group. However, there was an average increase of 15% immediately after exposure to hyperoxia, which persisted after the recovery period.

Qualitative changes in tracheal architecture, evaluated by optic microscopy, revealed that the 50%O₂ group suffered an increase in the thickness of the extracellular matrix and degranulated mast cell density in the submucosa and adventitia adjacent to the TSM, without further changes when compared with the control group at 15 days of age. The changes in extracellular matrix were reversible after recovery in ambient air. Mast cell density remained higher than that of the control group at 36 days of age, and more contiguous to TSM than the 50%O₂ group.

In conclusion, it has been demonstrated that moderate levels of chronic neonatal hyperoxia induce changes in TSM contractile response and tracheal structure, which may be functionally expressed after discontinuation of exposure. Therefore, the original contribution of the present work was the development of an animal model which allows the evaluation of the mechanisms through which hyperoxia alone can induce **chronic changes** in contractility and relaxation of SM and also in airway structure that can be responsible for the persistent airway hyperresponsiveness found in patients who were submitted to neonatal oxygen therapy.

INTRODUÇÃO

I. EXPOSIÇÃO PULMONAR À HIPERÓXIA E STRESS OXIDATIVO

1. Stress oxidativo e lesão pulmonar

Pela sua localização, o pulmão está exposto a agentes oxidantes com origem no meio ambiente, o que explica que o aparelho respiratório seja o alvo principal deste tipo de agressão.

Existe actualmente evidência experimental de que a exposição do pulmão a agentes oxidantes é mediada por espécies reactivas de oxigénio (ROS) que desempenham um papel relevante na patogénese das alterações da permeabilidade e função ciliar do epitélio das vias aéreas, na hipersecreção de muco, na hiperreactividade brônquica e na perpetuação da inflamação das vias aéreas na asma, na bronquite crónica, na displasia broncopulmonar, na síndrome de dificuldade respiratória do adulto e na mucoviscidose, para citar alguns exemplos (Rahman & Macnee, 1996; Henricks & Nijkamp, 2001; Rahman *et al.*, 2006).

A agressão inespecífica do pulmão por ROS de origem exógena, leva à activação da NADPH-oxidase existente na membrana das células epiteliais, dos leucócitos e dos macrófagos residentes, o que resulta na produção endógena de espécies reactivas de oxigénio, reacção que é ainda potenciada pela activação da mieloperoxidase (MPO) e da peroxidase do eosinófilo (EPO) (Kinnula, 2005).

A nível molecular, as ROS têm capacidade para iniciar a resposta inflamatória no pulmão através da activação de factores de transcrição como o factor nuclear κB (NF- κB) e do activador da proteína 1 (AP-1), da indução de alterações estruturais na cromatina e da expressão de genes que codificam mediadores pró-inflamatórios (Rahman, 2000; Rahman, 2003). O consequente aumento da transcrição de citocinas e quimiocinas e da expressão de moléculas de

adesão, contribui para o recrutamento de células inflamatórias e para a perpetuação da lesão.

Demonstrou-se, também, que a administração de oxigénio em valores superiores aos do ar atmosférico (**hiperóxia**), pode provocar lesão do parênquima pulmonar e das vias aéreas, cuja gravidade depende da fracção de oxigénio inspirado (FiO_2) e da duração da exposição, tanto no homem como em animais em fases do desenvolvimento equivalentes (Jamieson *et al.*, 1986). Nos animais, a susceptibilidade à hiperóxia é específica da espécie e, dentro da mesma espécie, da estirpe (Frank *et al.*, 1978). Apesar de não se conhecerem em profundidade os mecanismos responsáveis pela toxicidade da exposição à hiperóxia, a maioria dos investigadores tem encontrado dados que apoiam a hipótese de a formação excessiva de ROS ser a mais importante causa directa de agressão nas fases iniciais da exposição (Freeman & Crapo, 1981; Crapo, 1986; Fracica *et al.*, 1991; Fracica *et al.*, 1994; Warner *et al.*, 1998). Crapo e colaboradores demonstraram que a hiperóxia induz, no pulmão, a produção de anião superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em consequência da amplificação do processo normal de redução do oxigénio molecular em água na cadeia respiratória mitocondrial, seguida pela formação de peróxido de hidrogénio (H_2O_2), de radical hidróxilo (HO^{\cdot}) e de peróxinitrito intracelular (Freeman & Crapo, 1981; Halliwell, 1991).

Nos modelos experimentais de exposição à hiperóxia, demonstrou-se que o recrutamento das células inflamatórias ao nível pulmonar contribui para a amplificação da produção de ROS, inicialmente induzida directamente pela administração exógena de oxigénio sobre células epiteliais, alveolares e brônquicas, (Kinnula *et al.*, 1991; Kinnula *et al.*, 1992; Pietarinen-Runtti *et al.*, 1998; Kinnula & Crapo, 2003) e pelas células do endotélio pulmonar (Holland *et al.*, 1990; Usatyuk *et al.*, 2003; Brueckl *et al.*, 2006).

A expressão morfológica da lesão pulmonar induzida pela exposição à hiperóxia é a alteração da arquitectura do parênquima e

das vias aéreas, em que as ROS actuam como segundos mensageiros intracelulares, induzindo apoptose, interferindo na regulação da proliferação celular e da actividade protease/anti-protease no pulmão (Rahman & Macnee, 1996; Rahman & Macnee, 1999).

2. Relação entre exposição a espécies reactivas de oxigénio (ROS) e *stress* oxidativo

O conceito de *stress* oxidativo foi introduzido por Sies, para designar a "*alteração do equilíbrio entre pró-oxidantes e antioxidantes favorecendo o primeiro, levando a lesão potencial*" (Sies, 1997). Neste processo, estão envolvidos átomos e moléculas capazes de existência independente, apesar de terem um ou mais electrões desemparelhados, como o anião superóxido e o radical hidróxilo. Moléculas derivadas do oxigénio, como o peróxido de hidrogénio, o peróxido de azoto e o ácido hipocloroso, apesar de não terem electrões desemparelhados na sua orbital externa, são altamente reactivas com as moléculas vizinhas (Halliwell, 1994; Halliwell, 1996; Sadeghi-Hashjin *et al.*, 1998a; Andreoli, 2000; Henricks & Nijkamp, 2001). De acordo com a sua composição química, designam-se os átomos e moléculas com estas características por **espécies reactivas de oxigénio (ROS) e de nitrogénio (RNS)**.

A estabilidade da maior parte das moléculas resulta de possuírem, em cada orbital, dois electrões com sentidos de rotação (*spins*) opostos, o que neutraliza o campo magnético gerado pela rotação individual de cada electrão. Com o oxigénio não é assim: a orbital externa contém dois electrões com sentidos de rotação iguais, o que implica que nas reacções em que participa se estabeleçam ligações com um electrão de cada vez, em processos de colisão independentes. Nestas reacções há tempo para a inversão do *spin* electrónico por interacção com os *spins* nucleares, formando-se espécies químicas intermediárias muito instáveis (D'Angio & Finkelstein, 2000). Em

condições fisiológicas, a maior parte do O_2 é reduzida pela citocromo-oxidase mitocondrial que contém dois grupos heme e dois de cobre (Cu^{2+}) no seu grupo prostético, o que lhe permite a redução do O_2 em duas moléculas de água (H_2O). Nesta reacção, a redução do oxigénio resulta, na sua maior parte, na formação de trifosfato de adenosina (ATP), substrato energético indispensável das células aeróbias. Apenas 0.4% a 4% escapa a este processo, dando origem a ROS que são neutralizadas por sistemas de defesa antioxidante com localização intra e extra-celular (Fridovich, 1998).

Considera-se que uma molécula é **antioxidante** se tiver pelo menos uma das seguintes propriedades: impedir a formação de ROS, ser capaz de os remover ou de reparar alterações induzidas pelas ROS noutras moléculas (Sies, 1991). Na Tabela 1 estão listados os principais sistemas antioxidantes, que podem ser enzimas com localização intra e extracelular ou moléculas de baixo peso molecular, como as vitaminas C e E (Pietarinen-Runtti *et al.*, 1998; Asikainen *et al.*, 2001; Asikainen & White, 2005).

Os principais antioxidantes pulmonares são as superóxido dismutases (SOD), a peroxidase do glutatião (GPx) e a catalase (CAT). As SOD catalisam a passagem do ião superóxido a peróxido de hidrogénio e oxigénio molecular, enquanto que enzimas intracelulares como a CAT actuam na fase seguinte da reacção, catalisando a passagem de duas moléculas de H_2O_2 a água e oxigénio molecular (Fridovich & Freeman, 1986; Fridovich, 1997; Kinnula & Crapo, 2003; Crapo, 2003). Outras moléculas antioxidantes, como o glutatião e a tioredoxina peroxidases (GPx e TPx) e as correspondentes redutases, têm uma acção semelhante à da catalase. A GPx reduz o H_2O_2 em H_2O através da oxidação do glutatião que é posteriormente reduzido pela redutase. Este efeito de recuperação do glutatião reduzido impede a depleção dos tióis intracelulares e tem um papel particularmente importante na oxidação dos hidroperóxidos orgânicos (Fridovich & Freeman, 1986; Rahman *et al.*, 2006).

Em condições fisiológicas, a produção contínua de ROS encontra-se em equilíbrio com o sistema de defesa antioxidante. Quer isto dizer que a produção de ROS é acompanhada por um consumo equivalente de antioxidantes, o que impede ou limita a lesão celular induzida pelo “*stress oxidativo*” tal como foi definido por Sies (Sies, 1991; Sies, 1997). Quando este equilíbrio se perde a favor da formação de ROS, instala-se um estado de *stress oxidativo* que é em muitos casos, se não o factor desencadeante, pelo menos um dos responsáveis pela perpetuação das reacções inflamatórias ou imunológicas, contribuindo para a manutenção da resposta e amplificação da lesão (Halliwell, 1996).

A primeira demonstração experimental da relação entre o oxigénio e a inflamação deve-se a Baldrige e Gerard que, em 1932, observaram um súbito aumento do consumo de oxigénio pelos neutrófilos do sangue periférico do cão quando expostos a bactérias. Este resultado foi inicialmente interpretado como sendo consequência do aumento da actividade metabólica necessária para a fagocitose (Baldrige & Gerard, 1932). No entanto, Sbarra e Karnovsky demonstraram que esta ideia não correspondia à realidade, já que o aumento do consumo de oxigénio durante a fagocitose era independente da actividade da cadeia respiratória (Sbarra & Karnovsky, 1959) e que estava antes associado à produção de peróxido de hidrogénio (Iyer *et al.*, 1961), molécula com uma importante acção bactericida. Actualmente sabe-se que a maior parte do oxigénio consumido durante a fagocitose se destina à síntese de anião superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e de peróxido de hidrogénio (H_2O_2), reacção catalizada sucessivamente pelos enzimas NADPH-oxidase e superóxido dismutase (SOD) e de ião hipoclorito, por acção das peroxidases dos neutrófilos e dos eosinófilos (van der Vliet & Cross, 2000).

TABELA 1 – SISTEMAS ANTIOXIDANTES

Grupos	Exemplos
<i>Enzimas antioxidantes "clássicos"</i>	Superóxido dismutases (SOD) – MnSOD e CuZnSOD e Extracelular (ECSOD) Glutatião (G) e Tiorredoxina (T) Peroxidases (Px) Glutatião (G) e Tiorredoxina (T) Reductases (R)
<i>Sistema do glutatião (GSH/GSSG) e tiorredoxina (Trx)</i>	
<i>Heme-oxigenases (HO)</i>	
<i>Antioxidantes de baixo peso molecular</i>	Vitaminas C e E

Estes resultados não só demonstram que as ROS têm um importante papel nos mecanismos de defesa do hospedeiro, como identificam as células inflamatórias como capazes de aumentarem de forma muito significativa a sua produção quando existe lesão tecidual. A elevada reactividade das ROS com a maior parte das macromoléculas, que lhes confere a eficácia enquanto bactericidas, tem contudo a contrapartida de não ser selectiva. As ROS participam em reacções de oxidação com hidratos de carbono, lípidos, proteínas e ácidos nucleicos, e provocam a desorganização da estrutura molecular e a modificação das funções biológicas dos tecidos envolvidos na reacção inflamatória, induzindo respostas celulares que resultam, por sua vez, na formação secundária de ROS (Babior, 2000).

3. Relação entre exposição à hiperóxia e a formação de ROS

Apesar de intuitivamente se admitir que a exposição à hiperóxia provoca um aumento do *stress* oxidativo, a demonstração experimental directa desta relação resulta, na sua maior parte, de estudos *in vitro* (Jamieson *et al.*, 1986; Parinandi *et al.*, 2003; Chowdhury *et al.*, 2005).

Demonstrou-se que a exposição de células alveolares a 100% de O₂, em condições normobáricas, resulta num aumento da produção de anião superóxido, peróxido de hidrogénio, lipoperóxidos, radical hidróxilo (HO[•]) e singuleto de oxigénio (¹O₂) (Figura 1) (Freeman & Crapo, 1981; Freeman & Tanswell, 1985).

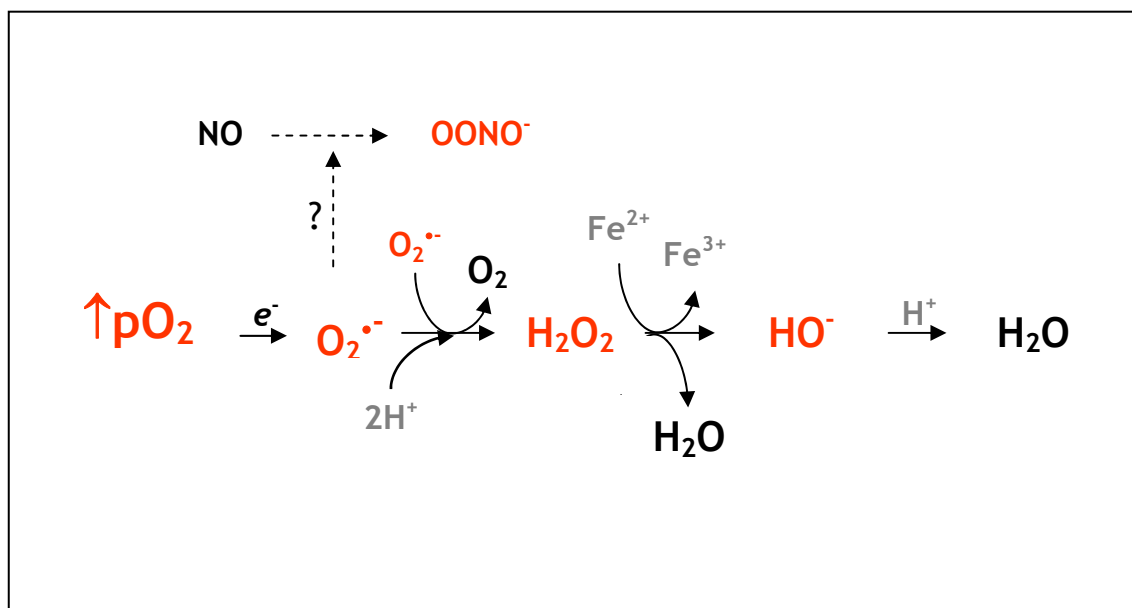
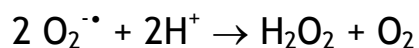


Figura 1 – Relação entre hiperóxia e produção de ROS. A exposição à hiperóxia induz sucessivamente aumento da produção de anião superóxido (O₂^{•-}), de peróxido de hidrogénio (H₂O₂) e de radical hidróxilo (HO[•]).

Anião Superóxido

Freeman e Crapo demonstraram que, em condições de hiperóxia, o aumento da utilização de oxigénio nas mitocôndrias ocorre, tal como acontece em condições fisiológicas, através de uma “fuga” na cadeia respiratória, em que um electrão é transferido do NADH ou da ubiquinona para o oxigénio, com formação de anião superóxido, que será tanto maior quanto maior for a pO₂. No pulmão, o principal dador de electrões é o NADH, uma vez que neste órgão as mitocôndrias são relativamente pobres em ubiquinona (Crapo, 1975; Freeman & Crapo, 1981).

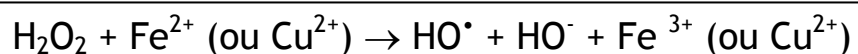
A maior parte do anião superóxido sofre *in vivo* uma reacção de dismutação catalisada pela superóxido dismutase (SOD), da qual resulta a formação de peróxido de hidrogénio e oxigénio molecular:



O anião superóxido, apesar de ser selectivo na sua reactividade com as moléculas vizinhas, é potencialmente mais lesivo que outras ROS, uma vez que pode difundir-se a maior distância do seu local de formação até encontrar uma molécula-alvo (Fridovich, 1986).

Peróxido de hidrogénio e radical hidróxilo

Demonstrou-se também que a produção pulmonar de H_2O_2 aumenta com a pO_2 (crescente até 100% O_2). O H_2O_2 aumenta linearmente entre 0% e 60% de oxigénio, sofrendo depois um aumento abrupto entre 60% e 100% de oxigénio. As fontes intracelulares de H_2O_2 são as mitocôndrias, os microssomas, as membranas nucleares e enzimas solúveis. Nos estudos *in vitro*, a relação mitocôndrias/microssomas aponta para que 85% da produção de H_2O_2 seja da responsabilidade dos microssomas (Kinnula *et al.*, 1991; Kinnula *et al.*, 1992; Kinnula *et al.*, 1995). O peróxido de hidrogénio tem uma reduzida reactividade com as moléculas vizinhas. Contudo, na presença de iões Fe^{2+} ou Cu^{2+} , pode gerar o radical hidróxilo:



Por sua vez, o Fe^{3+} não permanece livre em solução, ligando-se aos ácidos nucleicos e aos fosfolípidos das membranas adjacentes (Keyer *et al.*, 1995; Keyer & Imlay, 1996). Nesta reacção o radical mais instável e com maior toxicidade é o radical hidróxilo, que reage com qualquer estrutura na vizinhança imediata do local onde foi gerado (Halliwell, 1991). O radical hidróxilo tem capacidade para alte-

rar a estrutura de proteínas levando à quebra e desnaturação das cadeias polipeptídicas do DNA com modificação das bases e interrupção do ciclo celular. Altera também os lípidos insaturados através da oxidação dos ácidos gordos da membrana celular e dos organelos intracelulares, sendo estas últimas as alterações responsáveis pela alteração da permeabilidade celular induzida pela hiperóxia.

O H_2O_2 é facilmente difusível entre os meios intracelular e extracelular e actua como um mensageiro intracelular, necessário para a activação do factor de transcrição nuclear κB (NF κB). O NF κB é o factor de transcrição mais estudado em condições de hiperóxia, pela qual pode ser induzido directamente (Jany *et al.*, 1995; Shea *et al.*, 1996; Baldwin, Jr., 1996; Mantell & Lee, 2000; Mayo *et al.*, 2001). Tem capacidade de modular a expressão de citocinas e quimiocinas durante o *stress* oxidativo e está implicado em diferentes processos inflamatórios do pulmão (Blackwell & Christman, 1997; Barnes & Karin, 1997; Sadikot *et al.*, 2003). A regulação inapropriada da transcrição, mediada pelo NF κB e pelo activador da proteína-1 (AP-1), é considerada como uma potencial responsável da resposta inflamatória associada à hiperóxia (Barnes & Karin, 1997; D'Angio & Finkelshtein, 2000; Lee & Choi, 2003; D'Angio & Maniscalco, 2004).

4. Relação entre hiperóxia e a formação de espécies reactivas de azoto (RNS)

As ROS podem também reagir com outros radicais livres como o monóxido de azoto (NO), dando origem a moléculas com elevada citotoxicidade, como o anião peróxinitrito que é apontado como um potencial desencadeante da peroxidação lipídica (Sadeghi-Hashjin *et al.*, 1998a; Halliwell *et al.*, 1999). A hiperóxia parece estar associada a um aumento da produção de NO através da indução da actividade da sintetase inductível do NO (iNOS), cuja expressão é induzida por diferentes citocinas inflamatórias como o TNF α (Hesse *et al.*, 2004).

No entanto, a importância dos RNS na lesão pulmonar induzida pela hiperóxia é ainda controversa e os resultados de diferentes grupos têm sido discordantes, dependendo das condições experimentais (Bhandari, 2003).

5. Relação entre as ROS e a resposta inflamatória induzida pela hiperóxia

A demonstração experimental de que a exposição à hiperóxia desencadeia uma resposta inflamatória no pulmão teve em grande parte origem em protocolos de exposição de animais *in vivo*, a FiO_2 iguais ou superiores a 80% (Crapo, 1986; Mantell *et al.*, 1999; Deng *et al.*, 2000; Denis *et al.*, 2001; Auten *et al.*, 2001; Yi *et al.*, 2004).

Em murganhos de três estirpes diferentes, C57B1/6J, 129/J, e C3H/HeJ, identificaram-se citocinas libertadas pelo epitélio bronquial em resposta à exposição aguda a 100% de O_2 . Verificou-se que o aumento dos níveis de interleucinas (IL) IL-6, IL1 β , IL-3 e TNF α era semelhante nas três estirpes. Apenas variou a duração da fase de iniciação, enquanto o padrão de lesão celular da fase inflamatória foi semelhante nas três estirpes. Neste aspecto, a resposta à hiperóxia distingue-se da desencadeada por outros agentes indutores de *stress* oxidativo, como o ozono ou as radiações ionizantes, em que a resposta é muito variável entre espécies e estirpes (Johnston *et al.*, 1998).

Demonstrou-se também que as quimiocinas CXC (quimiotáticas para os neutrófilos) e a expressão dos seus ligandos aumentam no pulmão de murganhos expostos a 80% (Sue *et al.*, 2004) e a 95% de oxigénio (Deng *et al.*, 2000; Auten, Jr. *et al.*, 2001). A demonstração do aumento de P-selectina e da expressão de ICAM-1 (ligando para as β_2 -integrinas dos neutrófilos) em modelos semelhantes, reforçou a relevância dos neutrófilos na lesão do parênqui-

ma pulmonar induzida por níveis elevados de oxigénio (Welty *et al.*, 1993; Zeb *et al.*, 1996; Nishio *et al.*, 1998; Gerik *et al.*, 2003).

Os dados que implicam directamente as ROS na lesão das vias aéreas em humanos são relativamente escassos, limitando-se a estudos em células epiteliais isoladas e em células inflamatórias, observando-se lesão epitelial e diminuição do número e função ciliar (Beckett & Wong, 1988; Solway & Hershenson, 1995; Pietarinen-Runtti *et al.*, 1998). Em modelos animais, demonstrou-se que as ROS induziam aumento da contractilidade do músculo liso das vias aéreas (MLVA), através da administração *in vitro* de peróxido de hidrogénio em músculo de traqueia e em brônquio isolado de rato e de cobaia. O peróxido de hidrogénio, provoca não só a contracção directa do músculo liso de traqueia de bovinos, como o aumento da resposta contráctil a agentes colinérgicos, à histamina, à serotonina, à bradicinina e à substância P e ainda a proliferação de miócitos através das proteína-quinases activadas por mitogénios (MAPK) (Rahman, 2003; Romashko *et al.*, 2003). Também a peroxidação lipídica das membranas celulares e a formação de F2 α -isoprostano foram relacionadas com o aumento da contractilidade e a hiperplasia do MLVA (Sadeghi-Hashjin *et al.*, 1998a; Sadeghi-Hashjin *et al.*, 1998b; Henricks & Nijkamp, 2001)

II. A EXPOSIÇÃO PULMONAR À HIPERÓXIA EM FASES PRECOCES DO DESENVOLVIMENTO – CONTRIBUTO DOS MODELOS ANIMAIS

1. Exposição à hiperóxia, stress oxidativo e displasia broncopulmonar (DBP)

Uma área em que o papel do *stress* oxidativo associado à inflamação assume particular relevância diz respeito à patologia respiratória do recém-nascido, em particular do prematuro (Saugstad, 2001a).

Sabe-se que a extrema prematuridade, as infecções respiratórias neonatais – em particular pelo *ureaplasma ureoliticum* – são mais frequentes nas crianças com diagnóstico de displasia broncopulmonar (DBP) em quem persistem manifestações de morbilidade respiratória (ATS, 2003). Nestes casos, os estímulos inflamatórios iniciam-se muitas vezes ainda *in utero* e tendem a acentuar-se após o nascimento, quando os recém-nascidos são ventilados e sujeitos a oxigenioterapia por períodos prolongados e susceptíveis a infecções virais e bacterianas (Saugstad, 1985; Saugstad, 1989; Saugstad, 1996). Nestes doentes, considera-se que a morbilidade respiratória é consequente à reacção inflamatória das vias aéreas e do parênquima pulmonar, associada à menor eficiência dos sistemas de defesa antioxidantes. Nesta fase do desenvolvimento, o *stress* oxidativo resultante de diferentes tipos de agressão pulmonar é considerado um dos factores responsáveis por sequelas respiratórias permanentes (Saugstad, 2001b; Saugstad, 2003; Chess *et al.*, 2006), e pela predisposição para o desenvolvimento de patologia crónica que pode permanecer silenciosa durante o crescimento e manifestar-se apenas na idade adulta (Friedrich *et al.*, 2005). No entanto, a maioria dos estudos prospectivos nestes doentes apenas encontrou correlação significativa entre a DBP e a **prematuridade**, definida por tempo de gestação igual ou inferior a 28 semanas (Bancalari *et al.*, 2003; Belcastro, 2004), a **ventilação mecânica** e a **oxigenioterapia neonatal** (Ahrens *et al.*, 1991; Koumbourlis *et al.*, 1996; Kennedy *et al.*, 2000; Ng *et al.*, 2000; Doyle *et al.*, 2001; Mai *et al.*, 2003; Halvorsen *et al.*, 2005).

Apesar de os factores que contribuem para o *stress* oxidativo nestes doentes serem multifactoriais e difíceis de isolar, a avaliação das repercussões da oxigenioterapia neonatal em modelos animais permitiu demonstrar que a hiperóxia podia, por si só, induzir alterações estruturais e funcionais do pulmão.

1.1. Alterações morfológicas do parênquima pulmonar e das vias aéreas – contributo dos modelos animais

A avaliação da relação entre as alterações morfológicas do pulmão e a exposição a níveis elevados de oxigénio sobre o parênquima pulmonar do babuíno (Coalson *et al.*, 1982; Coalson *et al.*, 1992; Coalson *et al.*, 1999; Asikainen *et al.*, 2005), da ovelha (Walther *et al.*, 1986; Albertine *et al.*, 1999), do rato (Randell *et al.*, 1990; Shenberger *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1997; Belik *et al.*, 2003; Frank, 2003; Yi *et al.*, 2004; Wagenaar *et al.*, 2004) e do murganho (Amy *et al.*, 1977; Pappas *et al.*, 1983; Zeb *et al.*, 1996; Shea *et al.*, 1996; Wilborn *et al.*, 1996; Dager *et al.*, 2003; Auten *et al.*, 2005), permitiu conhecer o perfil celular da resposta à hiperóxia, a sua evolução temporal, as características das alterações da arquitectura alveolar e as repercussões correspondentes sobre a função respiratória.

Nos primeiros trabalhos, dos quais James Crapo fez uma revisão detalhada (Crapo, 1986), avaliaram-se as repercussões da exposição a níveis elevados de oxigénio sobre o parênquima pulmonar em fases precoces do desenvolvimento de diferentes espécies animais. Verificou-se que as alterações estruturais passavam por uma sequência de fases muito semelhante entre as diferentes espécies animais e o homem e que apenas a duração e a gravidade de cada fase variavam (Crapo, 1986). Uma vez que o murganho e o rato expostos à hiperóxia logo após o nascimento apresentavam alterações estruturais semelhantes às dos animais de médio porte e aos humanos, foram considerados modelos adequados de DBP.

Demonstrou-se também que a gravidade das alterações histológicas era dependente de uma forma não linear da fracção inspirada de oxigénio, podendo identificar-se dois tipos de lesão: a provocada por níveis letais de oxigénio (superiores a 85%O₂) que levam à morte em poucos dias; e as provocadas por FiO₂ iguais ou inferiores a

85% O₂, compatíveis com a sobrevivência por períodos mais alargados. Crapo sistematizou estas alterações morfológicas do parênquima pulmonar em cinco fases, de acordo com a gravidade da hiperóxia (letal e não letal): fase de iniciação, fase inflamatória, fase destrutiva, fase proliferativa e fase de fibrose.

Na **fase de iniciação**, as alterações são predominantemente bioquímicas e moleculares, sem repercussões estruturais visíveis em microscopia óptica ou microscopia electrónica. A sua duração, que pode ser de vários dias ou semanas com níveis não letais de oxigénio, não ultrapassa as 72 horas com FiO₂ superiores a 85%O₂. De facto, a curva de “dose-resposta” à hiperóxia tem, nesta fase, um declive acentuado: a redução de 100% de O₂ para 85% faz com que o início da fase inflamatória só seja observável às 72 horas, altura em que a maioria dos animais expostos a 100% já não sobrevive (Crapo, 1986).

Nos primatas, a exposição contínua a 60% de O₂ não provoca lesões imediatas significativas no parênquima pulmonar. A observação, neste modelo, da existência de fibrose intersticial oito semanas depois da exposição contínua por quinze dias, chamou a atenção para um aspecto particularmente interessante: mesmo na ausência de alterações morfológicas imediatas, a estimulação de processos bioquímicos e funcionais na fase de iniciação traduz-se, a longo prazo, por alterações da arquitectura do pulmão (Coalson *et al.*, 1992).

A **fase inflamatória** é marcada por alterações subtis da ultraestrutura das células endoteliais, que resulta no aumento da permeabilidade vascular, na formação de edema pericapilar e no alargamento da barreira alvéolo-capilar. Segue-se a acumulação de células inflamatórias no interstício pulmonar, provenientes da circulação pulmonar e a estimulação de macrófagos alveolares (Crapo, 1986).

No rato exposto a níveis letais de oxigénio, as primeiras imagens de destruição capilar surgem às 48 horas e o número de pla-

quetas no pulmão duplica (Barry & Crapo, 1985). Segue-se a acumulação de neutrófilos activados na microcirculação, nos septos interalveolares e alvéolos, que dá lugar à rápida amplificação da extensão da lesão (Keeney *et al.*, 1995). Estes resultados levaram à avaliação do papel dos neutrófilos na lesão induzida por níveis letais e sub-letais de oxigénio, tendo-se demonstrado que estas células são mediadores importantes da lesão hiperóxica já que, em algumas situações experimentais, a indução de neutropénia pode reduzir a gravidade da lesão (Keeney *et al.*, 1995; Deng *et al.*, 2000; Auten *et al.*, 2001; Yi *et al.*, 2004). Contudo, nestas condições de hiperóxia os neutrófilos não parecem ser indispensáveis na patogénese das lesões microvasculares e do edema pulmonar, uma vez que persistem, ainda que com menor gravidade, mesmo em condições de neutropénia (Perkowski *et al.*, 2006).

A exposição a níveis sub-letais de oxigénio não só atrasa o início da fase inflamatória, como diminui a sua magnitude e duração. No rato, os primeiros elementos figurados do sangue a surgirem na microcirculação e no interstício pulmonar são as plaquetas, a partir das 48 horas de exposição a 85% de oxigénio, aumentando progressivamente até ao terceiro dia e voltando a valores normais ao quinto dia. Os neutrófilos aumentam transitoriamente após cerca de cinco dias de exposição, reduzindo-se para valores negligenciáveis a partir do sétimo dia (Crapo, 1986).

Na **fase destrutiva**, há destruição das células do parênquima pulmonar, começando esta pouco depois do início da fase inflamatória. Com níveis de oxigénio superiores a 85% há agravamento do edema e aumento da densidade de polimorfonucleares no interstício, marcada destruição do endotélio capilar e hemorragia alveolar. Horas antes da morte do animal, a massa total de células endoteliais já está reduzida a 50%. Após a morte, as células endoteliais residuais apresentam lesão da membrana celular, marginação e alteração da

estrutura da cromatina, dilatação das cisternas do retículo endoplasmático, edema intracelular e necrose.

Em ratos expostos a níveis sub-letais de oxigénio, 40%-50% das células do parênquima pulmonar, em particular das células endoteliais, estão destruídas ao fim de sete dias. A partir desta altura o processo estabiliza e as células endoteliais residuais apresentam hipertrofia do citoplasma e dos organelos intracelulares. Nos animais que voltam para o ar ambiente nesta fase, o endotélio recupera gradualmente a sua ultraestrutura normal, apesar de o leito capilar alveolar se manter substancialmente reduzido (Crapo *et al.*, 1980).

Quanto à **fase proliferativa**, não é mais do que a fase de reparação da lesão e apenas se observa nos animais expostos a níveis de oxigénio iguais ou inferiores a 85%. Envolve todas as estruturas dos septos interalveolares e inicia-se em paralelo com a destruição do endotélio capilar sendo, provavelmente, responsável pela sobrevivência dos animais. No rato, o número de células intersticiais quadruplica, predominantemente fibroblastos e monócitos, sendo a escassez relativa de polimorfonucleares relativamente aos monócitos uma característica diferencial entre a resposta à hiperóxia letal e subletal. Há também proliferação das células alveolares de tipo II, enquanto que as células de tipo I se reduzem após sete ou catorze dias em 85% de oxigénio. Em níveis superiores a 85% de oxigénio, não há reparação da lesão (Crapo, 1986).

Finalmente, após períodos prolongados de exposição a níveis subletais de oxigénio e/ou exposições agudas seguidas de recuperação em normóxia, observa-se a **fase de fibrose**, que se caracteriza pelo aumento da espessura do interstício alveolar, resultante da deposição de colagénio e da proliferação de células intersticiais. A este propósito, Yi e colaboradores, que avaliaram o efeito da inibição da migração de neutrófilos para o parênquima pulmonar após a exposição por 14 dias a 60%O₂, concluíram que as alterações morfológicas são o resultado da coexistência de dois fenómenos distintos: do efei-

to estimulador da administração de níveis moderados de oxigénio sobre a alveologénese, e da inibição deste processo causada pela migração de neutrófilos induzida pela formação subsequente de ROS (Yi *et al.*, 2004).

Os resultados destes trabalhos permitiram concluir que a administração de níveis elevados de oxigénio, em particular nas fases precoces da maturação pulmonar, tem efeitos sobre o desenvolvimento e maturação do parênquima, que se caracterizam por uma resposta inflamatória com padrão predominante Th₁ (com predominância de neutrófilos), que se instala após um período sem alterações morfológicas visíveis. Segue-se a fase de destruição capilar e dos septos alveolares.

A cronicidade da exposição, possível com níveis sub-letais de oxigénio, ocorre não com a persistência ou agravamento da resposta inflamatória como se poderia esperar, mas pela evolução para uma fase proliferativa, de reparação, com proliferação de fibroblastos, das células alveolares e fibrose intersticial.

Foi possível também verificar que estas alterações eram dependentes da FiO₂ e da duração da exposição, estabelecendo-se uma relação causal com um factor de risco isolado, a hiperóxia, o que é impossível no humano, não só por razões éticas, mas também porque nos doentes concorrem diferentes factores de agressão das vias aéreas e do parênquima pulmonar em que o *stress* oxidativo é multifactorial.

O contributo destes resultados para a prática médica foi a redução da FiO₂ administrada aos prematuros e da duração da exposição, pela maior parte das unidades de tratamento de recém-nascidos (D'Angio & Maniscalco, 2004; Van Marter, 2005), apesar de não se ter ainda demonstrado que as repercussões sobre o prognóstico nos primeiros meses de vida sejam significativas (Harling *et al.*, 2005).

Ao contrário do que acontece relativamente ao parênquima pulmonar, a informação disponível sobre as repercussões da exposição à hiperóxia sobre a morfologia das vias aéreas é muito escassa.

Entre 1960 e 1980, dados obtidos a partir de peças de autópsia de prematuros ventilados e sujeitos a oxigenioterapia revelaram não só as alterações do parênquima pulmonar previamente descritas, como das vias aéreas de condução (Wolfe & DeVries, 1975). Morfologicamente, as vias aéreas destes doentes apresentavam metaplasia epitelial pavimentosa, aumento do músculo liso e fibrose brônquica e peribrônquica (Northway, Jr. *et al.*, 1990; Margraf *et al.*, 1991), aspectos que são semelhantes aos encontrados na asma brônquica (NIH, 2005). Existe também evidência experimental de que a exposição *in vivo* do murganho e do rato a níveis elevados de oxigénio induz, na traqueia e brônquios, alterações da matriz extracelular com deposição intersticial de colagénio, fibrose peribrônquica e peribronquiolar, hiperplasia glandular e aumento da camada muscular. Uma vez que estas características são sobreponíveis às encontradas nos doentes sujeitos a oxigenioterapia neonatal, o rato e o murganho hiperóxicos são também considerados modelos adequados das alterações das vias aéreas da DBP (Appleby & Towner, 2001; Bourbon *et al.*, 2005).

A adopção de estratégias de ventilação e oxigenioterapia neonatal menos agressivas, a par dos novos recursos terapêuticos disponíveis para os recém-nascidos prematuros, resultou no desaparecimento da maior parte destas alterações estruturais nas vias aéreas. No entanto, uma percentagem significativa destas crianças tem, ao atingir a idade escolar, queixas respiratórias persistentes e aumento da reactividade brônquica a estímulos inespecíficos (Pelkonen *et al.*, 1997). A demonstração, em estudos desta nature-

za, de uma relação estatística entre a oxigenioterapia neonatal e a obstrução reversível das vias aéreas, não significa necessariamente que a exposição à hiperóxia seja um factor relevante na patogénese deste fenómeno. No período neonatal, em particular no recém-nascido prematuro, concorrem para além das intervenções terapêuticas e infecções respiratórias *in útero* ou neonatais os factores inerentes à imaturidade pulmonar, que contribuem também para o desenvolvimento de sequelas respiratórias persistentes (Saugstad, 2003).

2. Alterações funcionais do músculo liso - hiperreactividade brônquica (HRB)

2.1. Desenvolvimento pós-natal do pulmão e HRB

Em indivíduos saudáveis, a prevalência da hiperreactividade brônquica (HRB), entendida como a resposta exagerada do músculo liso das vias aéreas (MLVA) a estímulos inespecíficos, é maior nas crianças que nos adultos (Hopp *et al.*, 1985; Sparrow *et al.*, 1987). As alterações fisiológicas resultantes da maturação do MLVA podem contribuir para a diferente prevalência entre crianças e adultos de doenças caracterizadas pela presença de HRB, como a asma (Panitch *et al.*, 1989; Sparrow & Mitchell, 1990; Chitano & Murphy, 2003; Chitano *et al.*, 2005).

Os mecanismos propostos como responsáveis pela modificação da HRB com a idade incluem factores estruturais, nervosos e farmacológicos. A orientação espacial das vias aéreas, a impedância à contracção do músculo liso (representadas pela cartilagem e pela tracção elástica do pulmão) e as propriedades contrácteis do músculo liso passam por processos de maturação no período pós-natal que podem modificar a reactividade do MLVA (Van der Ent *et al.*, 1996; Sneyvangers *et al.*, 2004). Assim, o conhecimento da ontogénese dos mecanismos de contracção e relaxamento do músculo liso em

fases precoces do desenvolvimento pós natal – uma área onde a informação disponível ainda é reduzida – pode contribuir para a compreensão da patogénese da HRB (Wang *et al.*, 2005).

O desenvolvimento estrutural das vias aéreas de condução e uma parte significativa da sua maturação já se encontram concluídas no recém-nascido de termo, altura em que estão formados apenas 10% do número total de alvéolos do pulmão adulto. Assim, o pulmão do recém-nascido não é uma miniatura do do adulto: embora a divisão das vias aéreas esteja completa no final da gestação, as proporções relativas e a maturação funcional das estruturas constituintes da parede continuam após o nascimento (Burri & Hislop, 1998) bem como a multiplicação alveolar (alveolarização) que passa por duas fases distintas no período pós-natal (Burri, 1984). Na primeira fase, de alveolarização rápida, assiste-se à formação da maior parte dos alvéolos durante os primeiros seis meses de vida. Segue-se um período de multiplicação lenta que se mantém até aos 18 - 24 meses de idade, durante a qual se assiste à redução progressiva do interstício pulmonar (Hislop, 2002; Burri, 2006). A partir desta fase e até ao início da idade adulta, dá-se o aumento progressivo dos volumes pulmonares, com alongamento e alargamento das vias aéreas e expansão alveolar. Os dados morfométricos demonstraram que entre o nascimento e a idade adulta se dá um aumento de duas a três vezes no comprimento e no diâmetro das vias aéreas (Burri & Hislop, 1998; Jeffery, 1998; Hislop, 2002). Quanto ao parênquima, o volume pulmonar aumenta 23 vezes, o volume capilar 25 vezes e o interstício pulmonar seis vezes (Burri, 2006). Assim, a relação entre o volume pulmonar e as vias aéreas é menor na criança que no adulto, o que resulta uma menor tracção elástica do parênquima sobre as vias aéreas distais que têm um contributo significativo para a resistência total ao débito aéreo durante a infância (Jeffery, 1998).

À semelhança do que acontece durante o desenvolvimento fetal, durante a infância, a espessura da parede das vias aéreas au-

menta proporcionalmente ao diâmetro, em parte à custa do crescimento do músculo liso ao longo do primeiro ano de vida (Burri & Hislop, 1998). No pulmão fetal, as células musculares lisas começam a surgir na traqueia no início do estadio pseudoglandular, entre a sexta e a oitava semanas, e estendem-se até aos brônquios segmentares a partir da décima segunda (Burri, 1984). Depois, o músculo estende-se sequencialmente ao longo dos bronquíolos terminais e respiratórios. Logo após o nascimento há uma aceleração no crescimento do MLVA, provavelmente desencadeado pela passagem para o ar ambiente e pelo início da ventilação espontânea (Jeffery, 1998). A comparação entre recém-nascidos de termo e prematuros, 10 dias após o parto, revelou que, nestes últimos, a quantidade relativa de músculo nas vias aéreas com perímetro maior que 1500 μm era superior (Sward-Comunelli *et al.*, 1997). Demonstrou-se, no mesmo trabalho, que a massa de músculo corrigida para as dimensões das vias aéreas se mantém praticamente constante entre a 25^a e a 36^a semanas. Estes dados são sugestivos de que intervenções como a ventilação assistida e a oxigenioterapia no período neonatal possam induzir alterações estruturais que predisponham ao desenvolvimento de HRB (Sward-Comunelli *et al.*, 1997; Burri & Hislop, 1998; Jeffery, 1998). Contudo, apesar de se terem identificado diferentes factores mitogénicos para o músculo liso em cultura de células, não se conhecem ainda os mecanismos responsáveis pela hiperplasia e hipertrofia do MLVA nestes doentes.

O desenvolvimento pré-natal do músculo liso caracteriza-se pelo aparecimento sequencial de proteínas contrácteis e do citosqueleto, desde um estadio indiferenciado, em que se expressa uma quantidade muito reduzida de proteínas contrácteis e tem uma actividade predominantemente secretora, até à célula madura com o aparelho contráctil completamente diferenciado (Low & White, 1998). No entanto, os miócitos maduros conservam a capacidade de modificar o seu fenótipo, o que lhes permite voltar a um estado mais

indiferenciado, segregando proteínas da matriz extracelular, citocinas e quimiocinas, passar a um estado proliferativo ou assumir um comportamento predominantemente contráctil (Hirst *et al.*, 2004; Sukkar *et al.*, 2004; Howarth *et al.*, 2004; Halayko *et al.*, 2006). Esta multifuncionalidade que o MLVA conserva após a sua completa maturação, é designada por “plasticidade fenotípica” (Halayko *et al.*, 2006), considerando-se actualmente que o ML não só é o efector do broncospasmo agudo (fenótipo contráctil) como um elemento activo nas alterações da arquitectura das vias aéreas (fenótipo secretor) nas doenças inflamatórias crónicas do pulmão (Halayko & Amrani, 2003; Hirst *et al.*, 2004).

A maturação das fibras musculares lisas das vias aéreas, foi avaliada a intervalos curtos desde o início do estadio pseudoglandular até ao final do estadio canalicular, quando pulmão ainda é relativamente pequeno. No murganho, pode-se observar uma bainha de músculo liso envolvendo os túbulos que representam a futura traqueia e brônquios principais a partir do décimo primeiro dia do estadio embrionário (Sparrow & Lamb, 2003). No estadio pseudoglandular as células musculares lisas formam uma bainha muito fina à volta da base, invaginação epitelial que dará origem às vias aéreas e podem ser identificadas por técnicas imunohistoquímicas de marcação da α -actina, calponina (Tollet *et al.*, 2001) e diferentes isoformas das cadeias pesadas de miosina (SM-22 α) (Low & White, 1998).

Nesta fase do desenvolvimento, à semelhança do que acontece no rato e no murganho, o MLVA do humano dispõe-se em feixes perpendiculares ao grande eixo das vias aéreas, excepto nas zonas de bifurcação, onde adoptam uma disposição oblíqua. Na traqueia, ocupam inicialmente toda a circunferência mas, com o desenvolvimento da cartilagem, acabam por se localizar apenas na região dorsal. No final do estadio pseudoglandular, o MLVA forma um sincício ou uma rede de fibras musculares que dá lugar, durante o estadio

canalicular, a feixes bem individualizados que se entrecruzam entre si, assumindo uma disposição progressivamente mais compacta e perpendicular ao grande eixo das vias aéreas. Após o nascimento, dados obtidos por microscopia confocal no humano e em diferentes espécies animais encontraram uma variação de mais ou menos 20° na orientação dos núcleos do MLVA relativamente à perpendicular. Esta diferença de orientação relativamente ao período pré-natal não parece ter repercussões significativas sobre a resistência das vias aéreas durante a broncoconstrição (Sparrow & Lamb, 2003).

Os dados sobre os mecanismos reguladores da maturação do músculo liso, resultam de estudos em células mesenquimatosas em co-cultura com células epiteliais embrionárias, onde se verificou que a presença de uma membrana basal rica em laminina induzia a diferenciação das células do mesênquima em miócitos brônquicos (Yang *et al.*, 1998). Outros investigadores consideram que as forças mecânicas exercidas pelo parênquima pulmonar sobre o músculo liso são as responsáveis pela modulação do seu crescimento e diferenciação (Ramchandani *et al.*, 2000). Desconhece-se, contudo, qual a relevância destes mecanismos na modulação da contractilidade do MLVA *in vivo* e, em particular, durante o desenvolvimento e maturação pulmonar (Amrani & Panettieri, 2003).

Funcionalmente, o músculo liso começa por apresentar potenciais de acção espontâneos e contracções rítmicas no início do estadio pseudoglandular, característica que perde após o nascimento (Schittny *et al.*, 2000), quando passa a exibir contracções tónicas características das vias aéreas do adulto (Somlyo & Somlyo, 1994). No recém-nascido, a maior parte dos mecanismos reguladores do tónus das vias aéreas já está presente. No entanto, a sensibilidade do músculo liso brônquico do recém-nascido à estimulação colinérgica avaliada *in vitro* em condições isométricas, é superior à do adulto (Fayon *et al.*, 1994). Demonstrou-se, no porco recém-nascido, que as diferenças na resposta *in vitro* à estimulação com metacolina são

independentes da distribuição dos receptores muscarínicos, da massa de músculo e do seu conteúdo em miosina, bem como dos elementos não musculares da preparação (Murphy *et al.*, 1991a; Murphy *et al.*, 1991b). Uma explicação possível é a maior sensibilidade ao cálcio por parte do MLVA do recém-nascido, relativamente ao animal jovem e adulto (Sparrow & Mitchell, 1990).

Por outro lado, a avaliação da contractilidade do MLVA neonatal em condições isotónicas, veio revelar modificações na força e na velocidade de encurtamento semelhantes às encontradas no músculo liso de modelos de HRB. Na cobaia, verificou-se que a velocidade de encurtamento no MLVA se reduz a partir das 3 semanas de vida pós natal, o que foi atribuído ao aumento da resistência interna ao encurtamento por alteração das forças mecânicas durante o desenvolvimento. Neste modelo, verificou-se que a estimulação eléctrica do MLT induz o aumento progressivo da quinase das cadeias leves de miosina (MLCK) durante as três primeiras semanas de vida pós-natal, para depois se reduzir para os níveis registados logo após o nascimento. Os autores deste trabalho consideram que é o aumento da fosforilação das cadeias leves de miosina após estimulação que determina o aumento da velocidade de encurtamento nos animais jovens (Chitano *et al.*, 2005). No entanto, estes resultados só indirectamente permitem inferir que a maior taxa de fosforilação da miosina é o mecanismo responsável pelo aumento da velocidade de encurtamento em fases precoces do desenvolvimento pós natal (Chitano *et al.*, 2005). O facto de a velocidade de encurtamento do ML variar entre os diferentes órgãos pode ser atribuído a diferenças entre as proteínas contrácteis ou do citosqueleto, variações semelhantes às que ocorrem nas vias aéreas durante o desenvolvimento e às de células isoladas de asmáticos ligeiros, em que a velocidade de encurtamento é superior à de controlos saudáveis (Chitano & Murphy, 2003).

Outra característica comum às vias aéreas normais em desenvolvimento e à HRB é a falência da broncodilatação após uma inspiração profunda. Em indivíduos saudáveis, a inspiração profunda provoca broncodilatação se as vias aéreas forem previamente contraídas; a mesma manobra protege da resposta subsequente a um estímulo broncoconstritor (Scichilone & Togias, 2004; Simard *et al.*, 2005). Assim, a inspiração profunda tem como consequência um efeito protector contra a constrição brônquica excessiva e traduz a capacidade que o MLVA tem de adaptar a força contráctil a modificações do seu comprimento. No músculo liso este processo é muito rápido, permitindo-lhe manter a força constante enquanto sofre amplas variações de comprimento. Duas teorias estão propostas para explicar este fenómeno. A teoria da plasticidade, que defende que as células musculares lisas se adaptam a alterações do comprimento, através da modificação do número de elementos contrácteis em série e deixando as unidades em paralelo inalteradas. De acordo com esta hipótese, para que o ML se adapte a um novo comprimento, as fibras contrácteis separam-se para se voltarem a ligar de forma adaptada ao novo comprimento (Pratusevich *et al.*, 1995). Isto pode explicar o decréscimo inicial da força após o estiramento, retornando progressivamente ao valor basal. Esta hipótese é reforçada pelo facto de se ter verificado que a velocidade máxima de encurtamento é directamente proporcional ao comprimento, mesmo depois da força se ter adaptado a um novo comprimento, o que sugere que se formaram mais unidades em série (Wang *et al.*, 2005). A contrapartida morfológica deste fenómeno foi observada em microscopia electrónica por Kuo e colaboradores, que verificaram que a densidade dos filamentos espessos da miosina se reduzia após o estiramento e aumentava após estimulações sucessivas dos miócitos (Kuo *et al.*, 2001; Kuo *et al.*, 2003).

A segunda teoria explica a adaptação do ML pela reorganização do citosqueleto e da matriz extracelular, em vez dos elementos con-

trácteis. Estes dois elementos são indispensáveis à regulação da contractilidade, uma vez que suportam as forças externas exercidas sobre a célula ML, mantêm a sua integridade e, quando o ML é estimulado, transmitem a força gerada pelas unidades contrácteis em cada célula para o sistema mecânico de medida. De acordo com esta teoria, a organização espacial da β -actina do citosqueleto e/ou a sua ligação às placas densas da membrana celular, têm a capacidade de se reorganizarem espacialmente quando o ML sofre um estiramento passivo, do que resulta o favorecimento das ligações entre a miosina e a α -actina. Com a activação da célula ML a organização dos filamentos torna-se mais fixa, permitindo que a força gerada e a velocidade de encurtamento sejam optimizados para a conformação que a célula tem no início da activação (Gunst & Fredberg, 2003). Ambas as teorias reconhecem que o rearranjo da actina é um elemento importante da adaptação do ML ao estiramento, tanto em termos da alteração do número de unidades contrácteis como na reorganização do citosqueleto e da sua ligação à membrana celular. Neste processo, a matriz extracelular pode estar também envolvida, uma vez que o estiramento provoca a sua deformação (Wang *et al.*, 2005).

Estudos recentes revelaram, numa análise de regressão multivariada que incluía os factores de risco para a asma atópica, uma correlação significativa entre a HRB e a duração da oxigenioterapia neonatal em recém-nascidos prematuros. Estes dados são sugestivos de que a HRB possa ser uma sequela da lesão precoce das vias aéreas causada pela exposição crónica a níveis elevados de oxigénio, apresentando os doentes um diferente fenótipo da asma brônquica, com risco de desenvolver doença pulmonar crónica obstrutiva (Halvorsen *et al.*, 2004; Halvorsen *et al.*, 2005). Contudo, não é possível avaliar no humano – em particular em recém-nascidos – se a administração de oxigénio representa por si só um factor de risco para o desenvolvimento de HRB. Neste contexto, uma parte significativa dos conhecimentos sobre a relação causal entre a exposição à

hiperóxia, as alterações da arquitectura das vias aéreas e a HRB resultaram da investigação em animais hiperóxicos, onde foi possível isolar o papel da administração exógena de oxigénio do papel de outros agentes de *stress* oxidativo no recém-nascido.

Uma vez que a maturação pulmonar do rato de termo é comparável à de um feto de 27 semanas, **o rato recém-nascido representa um modelo adequado da criança prematura**. Por outro lado, a maturação do pulmão desta espécie dá-se na sua maior parte durante as três primeiras semanas de vida, tornando possível avaliar num intervalo de tempo relativamente curto repercussões das agressões neonatais que no humano só se observam ao fim de anos (Broussard *et al.*, 2006).

2.2 HRB induzida pela hiperóxia – contributo dos modelos animais

A primeira publicação em que se demonstrou que a exposição a níveis elevados de oxigénio provoca o aumento da resposta contráctil do músculo liso brônquico *in vitro* e da resistência das vias aéreas, data de 1989, ano em que se demonstrou que a exposição de ratos adultos a FiO_2 de 85% induzia um aumento da reactividade brônquica *in vivo* e *in vitro* (Szarek, 1989; Szarek *et al.*, 1995). Seguiram-se outros trabalhos que confirmaram as observações de Szarek em ratos jovens (Hershenson *et al.*, 1992a; Hershenson *et al.*, 1992b; Solway & Hershenson, 1995), cujos aspectos metodológicos mais importantes da exposição à hiperóxia estão sintetizados na Tabela 2.

TABELA 2 – HIPERÓXIA COMO MODELO DE HIPERREACTIVIDADE BRÔNQUICA
ASPECTOS ESSENCIAIS DOS PROTOCOLOS

	FiO ₂ (%)	Idade (dias)	Tempo total de exposição (dias)
Hershenson <i>et al.</i> , 1992b; 1994c Naureckas <i>et al.</i> , 1995 Solway & Hershenson, 1995	O ₂ > 95 CO ₂ < 0.3	21	8
Agani <i>et al.</i> , 1997 Iben <i>et al.</i> , 2000	O ₂ > 95	7 e 13 a 15	7 4 a 6
Burghardt <i>et al.</i> , 1996 Boros <i>et al.</i> , 1997	O ₂ > 95 → 65 O ₂ > 95 CO ₂ < 0.5	21	10 a 18
Laudert <i>et al.</i> , 1994	O ₂ > 100 ou O ₂ > 50 (48 a 72h) → 100	2-12 h, 27, 48 e 96	7 21
Shenberger <i>et al.</i> , 1997	O ₂ > 95 CO ₂ < 0.3	4	14
Denis <i>et al.</i> , 2001 Fayon <i>et al.</i> , 2002	O ₂ = 50 ± 1	0 h	15

FiO₂ – fracção inspirada de oxigénio

A maioria dos investigadores usou ratos jovens da estirpe Sprague-Dawley que submeteu a níveis de oxigénio iguais ou superiores a 80% por períodos variáveis entre quatro e vinte e um dias consecutivos, considerando-se crónicas exposições com duração superior a uma semana (Tabela 3). Recentemente, um grupo afastou-se deste procedimento ao expor ratos da estirpe Wistar recém-nascidos e adultos a hiperóxia moderada (FiO₂ de 50%) durante quinze dias (Denis *et al.*, 2001; Fayon *et al.*, 2002). A razão da redução dos níveis de oxigénio residuiu na necessidade de os aproximar dos valores que são actualmente administrados no humano e que permite uma extrapolação mais adequada dos resultados.

TABELA 3 - PROTOCOLOS DE HIPERÓXIA *IN VITRO* - MÉTODOS

	Idade exposição O₂ (dias)	Estímulos músculo Liso	Parâmetros Funcionais	Morfometria
Szarek <i>et al.</i> , 1995	adultos	EFS Ach 10 ⁻⁸ -10 ⁻² M	CDR F _{max} (mN/mm) F _{max} /Am(mN/mm ²) EC _{50%}	Morfometria digital: Am normalizada para λm
Hershenson <i>et al.</i> , 1994c	21	EFS Ach 10 ⁻⁸ -10 ⁻³ M	CDR; EC _{50%} F _{max} /Am(g/mm ²)	Morfometria digital: λm; Am; Cálculo da massa média músculo
Agani <i>et al.</i> , 1997	7	EFS Ach 10 ⁻⁷ -10 ⁻³ M	F _{max} (g)	Morfometria digital: Am; volume do mús- culo: Am x 3 mm
Denis <i>et al.</i> , 2001 Fayon <i>et al.</i> , 2002	RN e adultos	Carbacol 10 ⁻⁸ -10 ⁻³ M	CDR; EC _{50%} F _{max} (mg) F _{max} /Am (g/mm ²)	Microscopia óptica: λm e Am; λe e Ae

M - molar; mN - 10⁻³ Newton; 5-HT - 5-hidroxitriptamina; Ach - acetilcolina; EFS - estimulação eléctrica a diferentes frequências; CDR - curva dose-resposta; E_{max} - Força isométrica máxima; EC_{50%} - concentração provocadora de 50% do efeito máximo; λm - comprimento de músculo; Am - área de músculo; λe - comprimento de epitélio; Ae - área epitelial.

2.2.1. Pressupostos da selecção dos modelos de HRB induzida pela hiperóxia

O desenvolvimento de modelos de hiperóxia, em particular os crónicos, pressupõe a escolha de espécies viáveis para os níveis de exposição pretendida e com capacidade de sobrevivência por períodos prolongados. A escolha da espécie e da fase do desenvolvimento é um dos aspectos determinantes, bem como a capacidade de o animal escolhido desenvolver tolerância a níveis de oxigénio potencialmente letais.

Sobrevivência em hiperóxia

a) Diferenças entre espécies

A capacidade de sobrevivência em condições de hiperóxia varia de espécie para espécie e, dentro da mesma espécie, com a fase da maturação em que se inicia a exposição (Yam *et al.*, 1978; Frank, 1991). Entre as diferentes espécies de animais (como o rato, a co-baia e o hamster), o rato Sprague-Dawley é o que tem maior capa-

cidade de sobrevivência, tanto no período neonatal como em adulto. Todos os adultos têm tempos de sobrevivência em hiperóxia inferiores aos animais que são expostos logo após o nascimento (Frank *et al.*, 1978; Frank, 1991; Laudert *et al.*, 1994). Uma explicação para estas diferenças foi avançada pelos mesmos autores que avaliaram a resposta à agressão directa do pulmão pelo oxigénio através da libertação de espécies reactivas de oxigénio (ROS), pelo doseamento da SOD, da CAT e da GPx. O doseamento destas enzimas revelou um aumento da sua actividade antioxidante (desencadeada pela exposição a $> 95\%$ de O_2) apenas no rato e no coelho jovens, o que pode explicar a maior capacidade que estas espécies têm de sobreviver em condições de hiperóxia em fases precoces do seu desenvolvimento. A ausência de alteração destas enzimas em adultos das mesmas espécies, associada a uma taxa de mortalidade superior, corrobora esta hipótese. Quanto à cobaia, que é de todos os animais estudados o mais sensível à hiperóxia, não se observaram alterações da actividade das enzimas antioxidantes.

Estes resultados fundamentam a escolha preferencial do rato recém-nascido e/ou jovem para os protocolos em que se avaliaram as relações entre a hiperóxia prolongada e a HRB.

b) Susceptibilidade à hiperóxia em animais jovens e adultos

A administração contínua de níveis elevados de oxigénio a animais em diferentes fases do desenvolvimento pôs em evidência a maior susceptibilidade dos adultos em relação aos animais mais jovens. Demonstrou-se que a causa de morte é o edema pulmonar, manifestando-se por edema frequentemente acompanhado de derrame pleural. A gravidade destas lesões tem uma relação directa com a idade em que se inicia a exposição ao oxigénio. Os animais com 27 dias apresentam um ligeiro aumento nos três primeiros dias, voltando ao valor de controlo entre os cinco e os catorze dias, enquanto que nos de 44 dias o edema pulmonar atinge o seu máximo no ter-

ceiro dia, reduzindo-se progressivamente até atingir os valores de controlo durante a terceira semana. Ultrapassada a fase de edema pulmonar, todos os animais desenvolvem hipertensão pulmonar e *cor pulmonale* com insuficiência respiratória (Laudert *et al.*, 1994).

Em ratos de 27 e 44 dias, a percentagem de sobrevivência após três a cinco dias de exposição contínua a 95%-100% de O₂ é de cerca de 80% (Laudert *et al.*, 1994), enquanto que apenas 20% dos animais de 48 e 96 dias sobrevivem mais do que duas semanas após a exposição (Laudert *et al.*, 1994; Burghardt *et al.*, 1996).

Entre os mais jovens, os recém-nascidos têm taxas de sobrevivência superiores a todos os outros nas primeiras duas semanas, mas maior susceptibilidade a exposições mais prolongadas.

Tolerância à hiperóxia

Verificou-se que ratos com quatro dias de vida podiam sobreviver cerca de um mês à hiperóxia, se fossem sujeitos nos dez primeiros dias a 95% O₂ e os restantes a 65% (Burghardt *et al.*, 1996). Neste caso, em que a morfometria foi realizada após dois dias de permanência em ar ambiente, houve um aumento da área de músculo sem alterações significativas do epitélio. A ausência de alterações epiteliais não pôde ser explicada pelos autores senão pela sua capacidade de recuperação imediatamente após a passagem para a atmosfera normal (Hershenson *et al.*, 1994a). A observação de hipertrofia do músculo liso da traqueia após a exposição neonatal de ratos Wistar a 50%O₂ durante duas semanas (Denis *et al.*, 2001), aponta para a hipótese de que a associação entre uma fase precoce do desenvolvimento e a exposição à hiperóxia poder resultar em hipertrofia ou hiperplasia persistente do MLVA, sendo as alterações epiteliais transitórias.

Tanto o rato como o murganho e o coelho adultos têm a capacidade de aumentar a actividade de algumas das suas enzimas antioxidantes em resposta à exposição a hiperóxia moderada, o que

resulta no desenvolvimento de tolerância para níveis de oxigénio de outra forma considerados letais. Atribui-se um papel importante à enzima manganésio superóxido dismutase (MnSOD) mitocondrial, que se exprime em todas as células pulmonares, preferencialmente nas células musculares lisas e endoteliais. Em condições de hiperóxia, esta enzima aumenta no homem, no babuíno e no rato (Yam *et al.*, 1978; Asikainen *et al.*, 2001).

2.2.2. Métodos de estimulação do músculo liso

Nos estudos *in vitro*, todos os trabalhos avaliaram o efeito da hiperóxia sobre a contractilidade do músculo liso através da estimulação colinérgica com agentes farmacológicos ou por estimulação eléctrica a diferentes frequências (EFS). Na EFS o efeito é semelhante ao da estimulação farmacológica, uma vez que parece actuar através da inibição da actividade da enzima acetilcolinesterase. A acetilcolina foi o agente farmacológico mais usado em concentrações crescentes mínimas entre 10^{-8} e 10^{-7} M e máximas de 10^{-3} ou 10^{-2} M (Tabela 3). Verificou-se que a exposição à hiperóxia provocava um aumento da força isométrica máxima (F_{\max}) após estimulação com acetilcolina ou EFS (Tabela 4), resultado que os autores interpretam como um aumento da reactividade colinérgica. Quanto à sensibilidade (expressa pela dose ou concentração de acetilcolina ou pela frequência eléctrica que provoca 50% da resposta máxima - $EC_{50\%}$), a EFS parece ser um método de estimulação mais potente, uma vez que revela alterações da sensibilidade do músculo liso que não são detectadas pela estimulação farmacológica.

TABELA 4 - PROTOCOLOS DE HIPERÓXIA *IN VITRO*: RESULTADOS

	Segmento das vias aéreas	Força isométrica máxima	EC _{50%}	Área músculo	Epitélio
Hershenson <i>et al.</i> , 1994c	Traqueia	↑ (g/mm ²)	não variou	↓	↓
Agani <i>et al.</i> , 1997	Traqueia	↑ (g)	não variou	↓	↓
Denis <i>et al.</i> , 2001 Fayon <i>et al.</i> , 2002	Traqueia*	↑ (mg)	não variou	↑	Não variou

EC_{50%} - concentração provocadora de 50% do efeito máximo; ↑ - aumento; ↓ - diminuição; * - não se observaram variações nos adultos

Nos estudos *in vivo* (Tabelas 5 e 6) verificou-se em todos os casos um aumento da sensibilidade à acetilcolina e à metacolina administradas por via endovenosa, sem variações significativas da reactividade avaliada pela resistência total do sistema respiratório.

2.2.3. Avaliação da resposta funcional e expressão dos resultados

Os grupos que realizaram estudos *in vitro* monitorizaram a força isométrica (Tabela 3), afastando-se da preferência pela força isotónica que é muito evidente em protocolos de outra natureza (por exemplo, sobre o desenvolvimento do músculo das vias aéreas). Esta opção poderá corresponder a uma tentativa de "isolar" funcionalmente o músculo das restantes estruturas da mucosa, uma vez que a força isométrica traduz apenas a força desenvolvida pelas proteínas contrácteis sem que haja encurtamento dos miócitos. Em contrapartida, não é possível avaliar outras propriedades do músculo liso brônquico que podem ser responsáveis pelo aumento da reactividade - mesmo sem hipertrofia - como a velocidade de encurtamento.

TABELA 5 - PROTOCOLOS DE HIPERÓXIA *IN VIVO*: MÉTODOS

	Idade exposição O ₂ (dias)	Estímulos músculo liso	Avaliação Fun- cional	Parâmetros Funcionais
Hershenson <i>et al</i> , 1992a	21	Metacolina (e.v.)	Pletismografia	CDR R _L máx EC ₂₀₀
Hershenson <i>et al</i> , 1992b	21	Acetilcolina aerosol	Pletismografia	CDR R _L máx EC ₂₀₀
Burghardt <i>et al</i> , 1996	4	Metacolina (e.v.)	Pletismografia	CDR R _L EC ₂₀₀
Iben <i>et al</i> , 2000	6-7 e 13-15	EFS	Pletismografia	CDR R _L e E _L

e.v. - endovenosa; EFS - estimulação eléctrica a diferentes frequências; CDR - curva dose-resposta; R_L - resistência total do sistema respiratório; E_L - elastância total do sistema respiratório; EC_{x%}/ED_{x%} - concentração/dose provocadora de x% de aumento do valor basal.

TABELA 6 - PROTOCOLOS DE HIPERÓXIA *IN VIVO*: RESULTADOS

	Resistência máxima	EC _{50%}	Área músculo	Epitélio
Hershenson <i>et al</i> , 1992a	não variou	↑	↑ (v.a. médio calibre)	↑
Hershenson <i>et al</i> , 1992b	—	↑	↑	↑
Burghardt <i>et al</i> , 1996	—	↑	↑	não variou
Iben <i>et al</i> , 2000	↑	↑	Não variou	-

↑ - aumento; ↓ - diminuição; - - parâmetro não avaliado; v.a. - vias aéreas

Um aspecto importante que ressalta dos estudos *in vitro* é a necessidade de usar amostras de anéis de traqueia ou dos brônquios principais, já que não é possível tecnicamente colocar nos suportes do transdutor brônquios de médio e pequeno calibre. Esta limitação não impediu de se demonstrar um aumento da contractilidade induzida pela hiperóxia nas vias aéreas de maior diâmetro (Tabela 4).

Relativamente à expressão dos resultados (Tabelas 4 e 6), existe uma enorme heterogeneidade (tal como em todos os estudos *in vitro* do MLVA) que se deve fundamentalmente à correcção da F_{\max} e da $EC_{50\%}$ para a área ou massa de músculo (Tabela 3). Os métodos morfométricos usados variam também de grupo para grupo, tornando muito difícil a comparação dos resultados. Contudo, quando os resultados são corrigidos para parâmetros morfométricos, é possível estabelecer relações morfo-funcionais uma vez que, teoricamente, passa a ser possível distinguir o componente do aumento de força que se deve simplesmente a hiperplasia ou hipertrofia, do que se deve a alterações intrínsecas da contractilidade.

Nos protocolos *in vivo*, a resistência total do sistema respiratório medida por pletismografia foi o método usado para avaliar a resposta das vias aéreas. O parâmetro escolhido pela maioria dos grupos para a expressão dos resultados foi a resistência do sistema respiratório, considerando significativo um aumento de 200% relativamente ao valor basal (Tabela 5). Nestes casos, existe maior uniformidade nos métodos de avaliação funcional e de expressão de resultados relativamente aos estudos *in vitro*.

3. Contributo dos modelos animais para a compreensão dos mecanismos da HRB induzida pela hiperóxia

Os grupos representados por Hershenson (Hershenson *et al.*, 1992a; Hershenson *et al.*, 1992b), Naureckas (Naureckas *et al.*, 1995) e Solway (Solway & Hershenson, 1995), avaliaram a relação entre as alterações do músculo liso e do epitélio das vias aéreas e o desenvolvimento de HRB induzida por $FiO_2 > 95\%$. Os trabalhos foram feitos na sua maioria *in vivo*, em ratos Sprague-Dawley de 28 dias, onde mediram a resistência das vias aéreas por pletismografia após uma semana de exposição contínua à hiperóxia (Tabela 5). Observou-se o aumento da sensibilidade a estímulos colinérgicos (metacolina e acetilcolina) e à estimulação eléctrica do nervo vago, sem

variações significativas da reactividade, resultados que se correlacionavam com a espessura do epitélio e com a área de MLVA de pequeno e médio calibre (Tabela 6). Num estudo *in vitro*, em anéis de traqueia (Hershenson *et al.*, 1994c), obtiveram resultados funcionais semelhantes, mas acompanhados de uma diminuição da área de músculo da traqueia. Este mesmo padrão, aumento da reactividade e redução da área de músculo na traqueia, foi encontrado por Agani e colaboradores em animais recém-nascidos expostos durante duas semanas a 95% de oxigénio (Agani *et al.*, 1997).

Estes resultados apontam para a hipótese de que níveis elevados de oxigénio induzam HRB através de alterações intrínsecas da contractilidade do MLVA centrais.

Em síntese, a exposição de pequenos animais a níveis elevados de oxigénio permitiu demonstrar que a hiperóxia induz alterações da contractilidade do músculo liso que se traduzem por um aumento da sensibilidade *in vivo* e da reactividade *in vitro* do músculo liso a estímulos constritores; provoca alterações da arquitectura das vias aéreas de médio e pequeno calibre que se traduzem, na maior parte dos casos, por aumento da espessura do epitélio e do músculo liso; na traqueia, observa-se um aumento da reactividade *in vitro*, não acompanhado por hipertrofia do músculo liso.

Verificou-se ainda que as alterações da arquitectura das pequenas vias aéreas se relacionavam com a sensibilidade a estímulos colinérgicos, e que esta relação podia ser parcialmente explicada pela hiperplasia e/ou hipertrofia do MLVA de pequeno e médio calibre (Hershenson *et al.*, 1994a; Solway & Hershenson, 1995). Estes autores encontraram ainda, em ratos da estirpe Sprague-Dawley expostos por oito dias a $\text{FiO}_2 > 95\%$, um aumento da actividade mitogénica do lavado bronco-alveolar sobre o MLVA, não dependente do factor de crescimento derivado das plaquetas (PDGF) (Naureckas *et al.*, 1995).

Estes modelos permitiram também a identificação de alguns dos mediadores responsáveis pelas alterações morfológicas e funcionais nas vias aéreas, tendo-se demonstrado que o aumento da síntese de leucotrienos induzida pela hiperóxia se correlaciona com a hiperplasia do MLVA de ratos Sprague-Dawley (Burghardt *et al.*, 1996; Boros *et al.*, 1997). Outro estudo demonstrou que a exposição à hiperóxia em fases precoces do desenvolvimento inibe o efeito relaxante do monóxido de azoto endógeno sobre o MLVA, resultados sugestivos de que o compromisso dos mecanismos de relaxamento pode ser responsável pela presença de HRB (Iben *et al.*, 2000).

Recentemente, um grupo retomou a avaliação das alterações morfo-funcionais induzidas em ratos Wistar recém-nascidos e adultos pela exposição por duas semanas a 50%O₂. Os resultados destes trabalhos foram especialmente interessantes, uma vez que revelaram que níveis moderados de oxigénio podem induzir alterações da resposta contráctil à estimulação colinérgica *in vitro* e hipertrofia do músculo liso na ausência de uma resposta inflamatória significativa, sendo estes efeitos exclusivos dos animais jovens (Denis *et al.*, 2001). Num subgrupo dos animais jovens, verificaram ainda que o relaxamento do MLT induzido pelo salbutamol aumentava no final do período experimental, resposta que foi diferente da observada em modelos sujeitos a níveis mais elevados de oxigénio (Fayon *et al.*, 2002).

Neste modelo, as repercussões imediatas das exposição crónica a hiperóxia moderada sobre o músculo liso são muito semelhantes às encontradas na asma brônquica, suportando assim a hipótese de que o *stress* oxidativo induzido pela oxigenioterapia neonatal possa ser um dos factores responsáveis pelas sequelas respiratórias que se encontram nestes doentes.

Não foi, contudo, avaliada a evolução após a exposição ter cessado. Este aspecto é particularmente relevante para o esclarecimento do papel da hiperóxia na patogénese das

queixas respiratórias que os doentes apresentam quando atingem a idade escolar.

Para tal é necessário, não só conhecer as repercussões morfo-funcionais imediatas da hiperóxia crónica neonatal sobre o MLVA, como a evolução dessas alterações após o estímulo ter cessado.

Os modelos animais de exposição à hiperóxia seguida de recuperação em ar ambiente têm contribuído não só para a compreensão dos mecanismos envolvidos as repercussões crónicas da BDP sobre o parênquima e a circulação pulmonares (Wilson *et al.*, 1985; Buckley *et al.*, 1996; Clerch *et al.*, 1998), como na patogénese da retinopatia do prematuro (Werdich *et al.*, 2004; Smith, 2004; Smith, 2005; Arjamaa & Nikinmaa, 2006).

Uma vez que é possível que a administração de oxigénio em fases precoces da maturação pulmonar e/ou o retorno para condições de normóxia induza modificações qualitativas ou quantitativas do MLVA, considera-se que o desenvolvimento de um modelo semelhante orientado para a avaliação das alterações morfo-funcionais das vias aéreas pode contribuir para o esclarecimento dos mecanismos da hiperreactividade brônquica persistente nos doentes sujeitos a oxigenioterapia neonatal.

OBJECTIVO

O **objectivo** deste trabalho foi avaliar, num modelo animal, se a exposição neonatal a hiperóxia moderada induz alterações funcionais e estruturais persistentes nas vias aéreas.

Os **objectivos específicos** foram os seguintes:

- **Desenvolver um modelo animal das repercussões crónicas da DBP sobre as vias aéreas**, através da exposição de ratos Wistar recém-nascidos a 50% de oxigénio durante duas semanas, seguidas de um período de três semanas de recuperação em normóxia.

Uma vez que este modelo implicava a avaliação em duas fases distintas da maturação neonatal – aos 15 e aos 36 dias de vida – começou-se por avaliar, nos grupos de controlo e nos grupos experimentais, as repercussões do desenvolvimento entre os 15 e os 36 dias de vida sobre a resposta *in vitro* do MLT à estimulação colinérgica e β_2 -adrenérgica, e da morfologia da traqueia. Avaliaram-se também as diferenças entre os sexos para os mesmos parâmetros, bem como para a susceptibilidade à hiperóxia.

- Retirar **implicações do modelo para a compreensão das repercussões crónicas da hiperóxia neonatal sobre as vias aéreas na displasia broncopulmonar em duas fases distintas**: imediatamente após a exposição e após três semanas de recuperação em ar ambiente. Nessa avaliação tomou-se especificamente em conta:
 - A sensibilidade e a reactividade do músculo liso de traqueia a doses cumulativas de brometo de metacolina e de salbutamol, avaliadas *in vitro* através da medição da força isométrica;

- O epitélio, o músculo liso, a matriz extracelular e a presença de células inflamatórias na traqueia, avaliados qualitativamente por microscopia óptica.
- A área de músculo da traqueia, avaliada por métodos morfométricos.

MATERIAL E MÉTODOS

I. ANIMAIS

Usaram-se ratos Wistar provenientes da colónia existente no Biotério da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa (Director: Professor Doutor Pedro Costa), onde são criados de acordo com as normas definidas na directiva comunitária 86/609/CEE (D. Ofic. Comunidade europeia 18.12.86 nº L358/28 a nº358/28; Decreto Lei nº 129/92; Portaria 1005/92). Estes animais descendem da linhagem de ratos Wistar *inbred* criada no Instituto Gulbenkian de Ciência.

Os animais dos grupos de controlo foram alojados em gaiolas de 42.5 cm x 26.6 cm x 18.5 cm e área de 0.8 m², em barreira microbiológica convencional e condições controladas de temperatura (entre 20°C e 24°C) e humidade (45% a 55%) com fotoperíodo de 12 horas de iluminação e 12 horas de escuridão e acesso a alimento *ad libidum*.

Os grupos experimentais foram transportados para uma sala do mesmo edifício onde se encontrava o equipamento para exposição a hiperóxia logo após o nascimento. Nesta sala, as condições de ambiente eram idênticas às daquela onde permaneceram os grupos de controlo e igualmente sujeitas a verificação diária. Nela permaneceram também os animais seleccionados para a recuperação em ar ambiente, após exposição à hiperóxia.

Os animais de ambos os grupos – ninhadas de oito elementos - foram mantidos com as respectivas progenitoras até ao 21º dia de vida, tendo a eutanásia sido efectuada por narcose com dióxido de carbono, cerca de vinte minutos antes da realização das experiências.

II. EQUIPAMENTO PARA EXPOSIÇÃO A HIPERÓXIA

O equipamento consiste numa câmara em acrílico, onde os animais foram colocados, e num sistema composto por um sensor (analisador) de oxigénio e um controlador do débito de gás.

Câmara de hiperóxia (Figura 2)

Câmara em acrílico (Biospherix Lda, EUA) com as seguintes dimensões: 75 x 50 x 50 cm e com capacidade para duas gaiolas para pequenos animais (42.5 x 26.6 x 18.5 cm, área 0.8 m²). As paredes laterais e posterior dispõem de dois conjuntos de 12 orifícios que podem ser encerrados individualmente, regulando a amplitude do contacto com o ar ambiente.

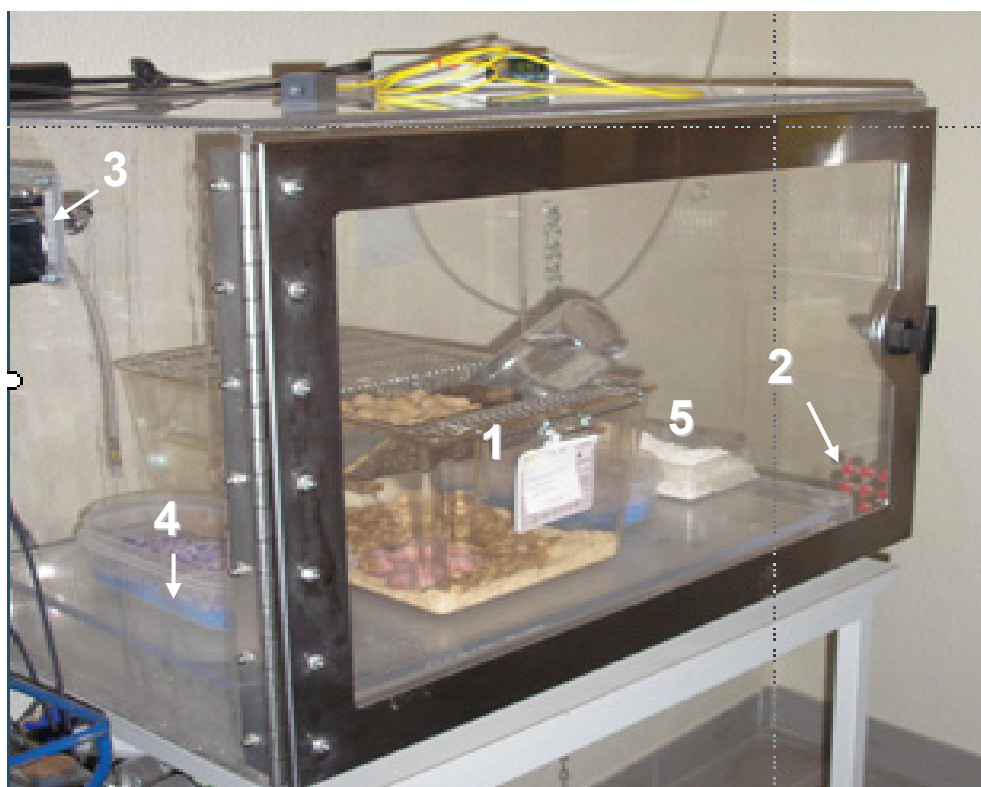


Figura 2 - Fotografia da câmara de hiperóxia. 1. gaiola 2. orifícios da parede lateral 3. encaixe do analisador de oxigénio e da entrada de gás; 4. recipiente com sílica gel; 5. recipiente com cal sodada.

Ainda na parede lateral, existe uma zona para adaptação do analisador de oxigénio. A câmara tem instalada no seu interior, junto

à entrada do analisador, uma ventoinha que mantém a circulação do ar enriquecido em oxigénio.

Analisador e controlador de oxigénio

A estabilidade do ar enriquecido em oxigénio na câmara é assegurada com um sistema composto por um analisador de oxigénio e um controlador da admissão deste gás (ProOx 110, Biospherix, EUA) (Figura 3).

O analisador de oxigénio, situado no interior da câmara, assegura a monitorização contínua da composição em oxigénio do ar. A percentagem de O₂ no interior do compartimento é seleccionada no controlador que regula a admissão do gás (com uma sensibilidade de 0.1%) através da abertura da válvula de entrada de O₂ até atingir o valor programado. Os valores do oxigénio na câmara são visíveis num écran analógico, com escala sensível até 0.1%, localizado no painel frontal do controlador (Figura 3).

Calibração do analisador de oxigénio

O analisador do ProOx 110 foi calibrado utilizando azoto (igual a 0% de oxigénio), 20%, 50% e 100% de O₂ com uma pressão de saída do gás de 5 psi.

Antes de se iniciar a utilização da câmara fizeram-se cinco medições em dias sucessivos, tendo-se verificado que, após o ajuste do ponto zero no *software* do analisador, a resposta do analisador era linear, com uma precisão da leitura de 100% em todos os pontos.

Repetiu-se o procedimento antes de cada grupo de animais ser introduzido na câmara, isto é, após períodos de quinze dias em funcionamento contínuo.

A precisão e linearidade de resposta do equipamento não se alteraram durante o período em que decorreu o estudo.

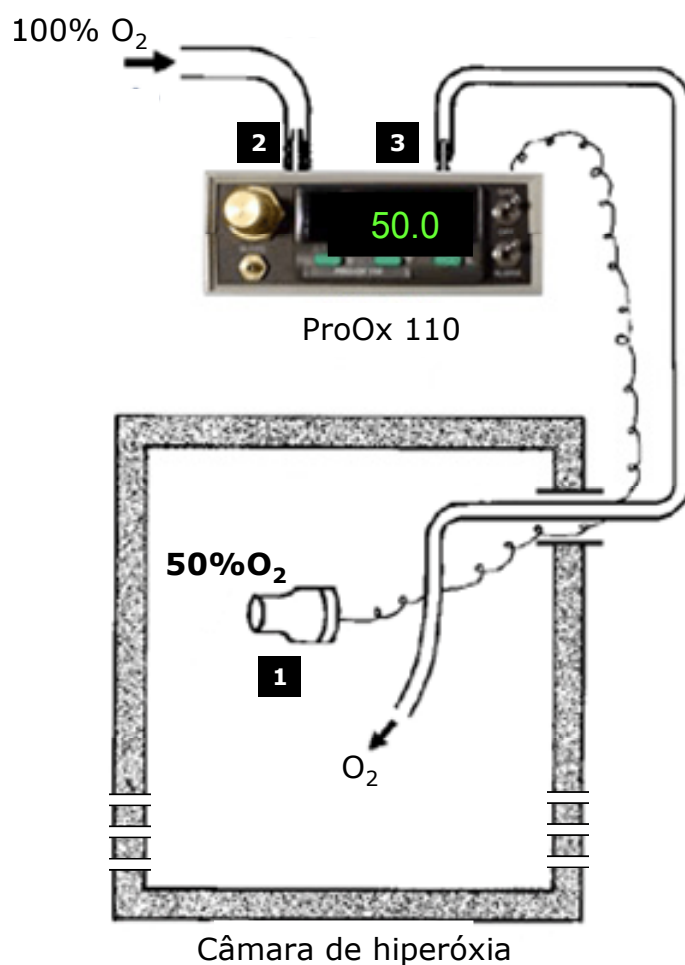


Figura 3 – Representação esquemática de equipamento para exposição a hiperóxia. O nível de oxigénio na câmara foi mantido constante pelo sistema PROOX 110, que mede a concentração de oxigénio no interior do compartimento a partir do sinal detectado pelo sensor (1) e regula o débito de saída de O_2 (2) pelo encerramento ou abertura de uma válvula que controla a admissão de O_2 para o sistema (3) a partir de um reservatório exterior.

Mistura de ar enriquecido com 50% de oxigénio

Com o equipamento atrás descrito, foi possível obter valores constantes de 50% O_2 na câmara, usando como fonte oxigénio a 99% em garrafas de 40 cm^3 (Ar Líquido, Portugal).

Através das aberturas nas suas paredes, o interior da câmara mantém o contacto com o ar ambiente, funcionando como "câmara de diluição" de oxigénio com concentração superior a 20.7%, o valor

medido na sala onde se encontra o equipamento. Assim, a partir de uma fonte de 99%O₂, procedeu-se ao enriquecimento do ar na câmara até se atingir o valor de 50%O₂, pré-programado no controlador ProOx 110. Uma vez atingido, o controlador encerrava a admissão de gás, corrigindo posteriormente qualquer variação da percentagem de O₂ igual ou superior a 0.1%.

III. EQUIPAMENTO PARA MEDIÇÃO DA FORÇA ISOMÉTRICA *IN VITRO* (Figura 4)

As repercussões funcionais da hiperóxia sobre as vias aéreas foram avaliadas através da medição da força desenvolvida por anéis

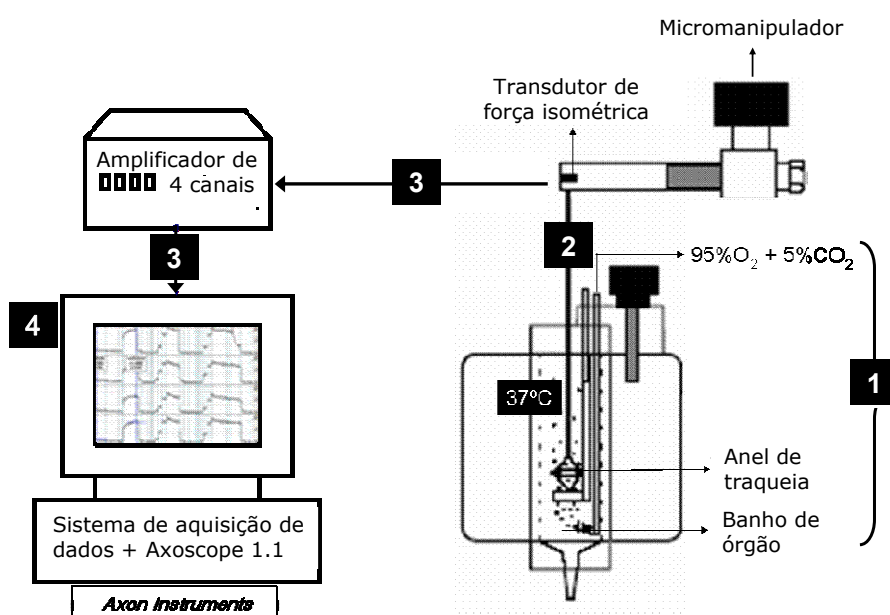


Figura 4 - Equipamento para medição e registo da força isométrica. 1. anel de traqueia - colocado horizontalmente no banho de órgão entre dois suportes não deformáveis; 2. suporte superior - ligado ao transdutor de força isométrica; 3. sinal - amplificado e transmitido à placa de aquisição de dados; 4. equipamento informático - visualização do sinal em tempo real e armazenamento de dados para análise posterior.

de traqueia colocados em banho de órgão e ligados a transdutores de força isométrica.

O equipamento para medição da força isométrica (EMKA Technologies, Paris, France) dispõe de quatro reservatórios para banho de órgão com capacidade de 20 mililitros (ml) e quatro transdutores de força isométrica, permitindo a avaliação simultânea de amostras de traqueias de quatro animais.

O sinal do transdutor isométrico é transmitido a um amplificador de quatro canais (EMKA Technologies, Paris, France) e recebido por um computador (processador 486) através de uma placa de aquisição de dados de 12 bits, Digidata 1200A (Axon Instruments, Inc, EUA).

A frequência de amostragem de 10/segundo da placa permite a visualização do sinal em tempo real no monitor do computador através do programa Axoscope, versão 1.1. (Axon Instruments, Inc, EUA), compatível com o sistema operativo Windows 98 (Microsoft Co., EUA).

A interferência eléctrica deste circuito, com uma variância igual a 0.01 mV, é suficientemente baixa para não prejudicar a análise do sinal.

Calibração

Verificou-se a linearidade da resposta dos transdutores entre 0.5 e 10 gramas, valores entre os quais se situa a gama de força gerada por amostras de músculo liso de traqueia, usando pesos de 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 5.0, 5.5 e 10.0 gramas.

IV. SOLUÇÕES E AGENTES FARMACOLÓGICOS

As soluções e agentes farmacológicos utilizados na avaliação da força isométrica *in vitro* foram os seguintes:

Solução de Krebs-Henseleit (KH) (mM) - NaCl 118.4, KCl 4.7, CaCl₂ 2.5, MgSO₄ 1.2, NaHCO₃ 24.9, KH₂PO₄ 1.2 e glucose 11.1.

Brometo de metacolina: C₈H₁₈NO₂Br, peso molecular 240.1g (Sigma) em concentrações entre 10⁻⁷ M e 10⁻¹M.

Salbutamol: C₁₃H₂₁NO₃, peso molecular 239.3g (Sigma) em concentrações entre 10⁻⁷ M e 10⁻¹M.

A solução de KH e as diferentes concentrações molares do salbutamol e do brometo de metacolina foram sempre preparadas no dia da experiência e as concentrações dos agentes farmacológicos foram calculadas para o volume final no reservatório de 20 ml.

Durante a experiência, a solução de KH foi mantida a 37°C e para assegurar a constância do pH, arejada continuamente com carbogênio (95%O₂ e 5% CO₂).

V. PROTOCOLO EXPERIMENTAL (Figura 5)

1. Exposição de ratos Wistar a hiperóxia moderada

Colocaram-se na câmara de hiperóxia (Figura 2) ratos Wistar recém-nascidos, entre as oito e as vinte e quatro primeiras horas de vida, tendo sido expostos durante quinze dias a 50%O₂ em condições isobáricas, procedimento semelhante ao descrito por Denis e colaboradores (*Denis et al., 2001*). Os animais, quatro machos e quatro fêmeas por ninhada, permaneceram com a progenitora numa gaiola com dimensões adequadas para comportar o seu crescimento durante o período de exposição.

Usou-se sílica gel para absorção do vapor de água e cal sodada para o dióxido de carbono. A temperatura e humidade na câmara

foram registadas diariamente, sendo os valores médios na câmara de $23.3 \pm 1.37^{\circ}\text{C}$ e de $57.1 \pm 4.55\%$, respectivamente.

A fracção de oxigénio na câmara, registada com intervalos aproximados de 24 horas, foi monitorizada continuamente pelo sistema ProOx 110, tendo-se mantido praticamente constante ($49.7\% \pm 1.31\%$) durante todo o estudo.

A câmara foi aberta diariamente durante cinco minutos para mudança da cal sodada e da sílica gel, e uma vez por semana, durante quinze minutos para limpeza e substituição de água e alimento para a progenitora da ninhada.

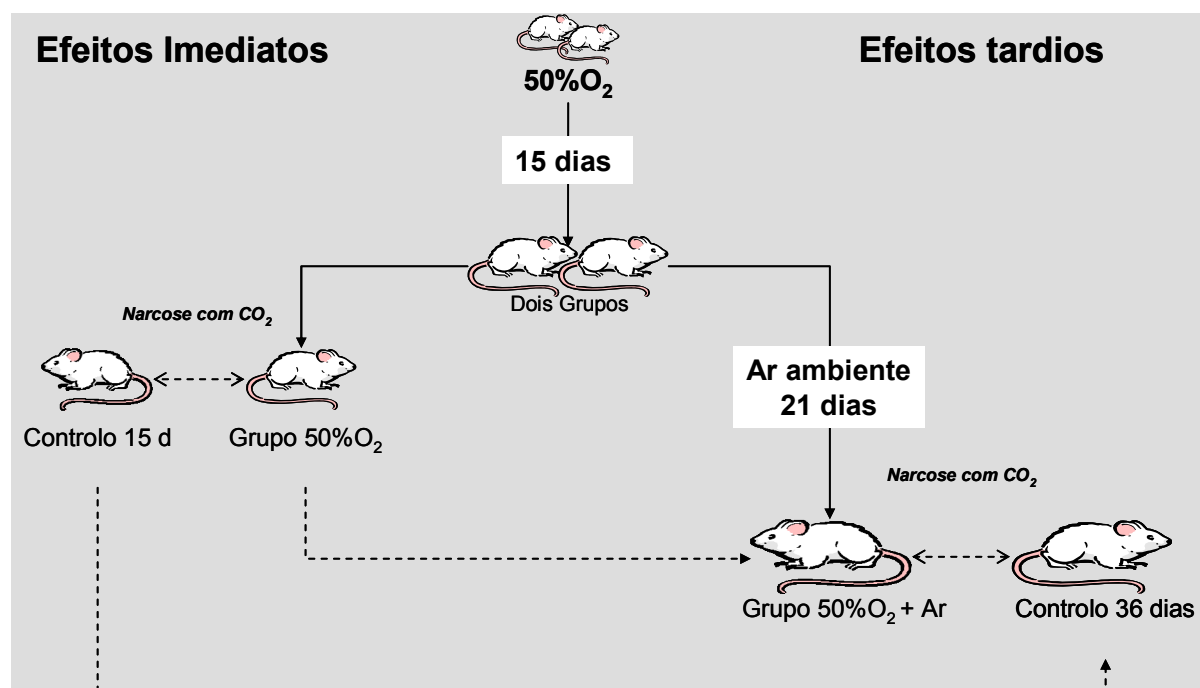


Figura 5 – Desenho experimental: Submeteram-se 48 ratos Wistar recém-nascidos a 50% de O_2 durante 15 dias. Um subgrupo destes animais, grupo $50\% \text{O}_2$, foi avaliado imediatamente após a exposição, enquanto que o outro voltou para o ar ambiente, grupo $50\% \text{O}_2 + \text{Ar}$, tendo sido avaliado ao fim de três semanas. Ambos os grupos experimentais foram comparados com grupos de controlo da mesma idade (Controlo 15d e Controlo 36d). Avaliou-se (---->) o efeito do desenvolvimento sobre a força isométrica e a área de músculo, nos grupos de controlo e experimentais e o efeito da recuperação relativamente aos efeitos da exposição a 15 dias de hiperóxia.

No final do período de exposição foram retirados da câmara, e:

1. Um subgrupo foi sacrificado imediatamente após, ao 15º dia de vida (grupo 50%O₂).

2. Um subgrupo foi colocado em ar ambiente, onde permaneceu durante três semanas até ao 36º dia de vida, em condições idênticas às da câmara de hiperóxia, excepto em relação à fracção de oxigénio no ar inspirado (grupo 50%O₂+ Ar).

2. Grupos de controlo

Os animais dos grupos experimentais foram comparados com grupos de controlo com a mesma idade - 15 dias e 36 dias - em idêntica proporção machos/fêmeas (Figura 5) e que, como já foi mencionado, permaneceram em ar ambiente em gaiolas com dimensões iguais e sob condições idênticas de temperatura (20°C a 24°C), humidade (45% a 55%) e exposição à luz (fotoperíodo de 12 horas), e com dieta semelhante para as progenitoras e animais desmamados (a partir do 21º dia).

Para evitar diferenças no desenvolvimento entre os animais em hiperóxia e os grupos de controlo que pudessem ser atribuídas à competição pela amamentação, o número de animais por cada progenitora foi sempre de oito.

3. Preparação do material de experiência

Todos os animais foram sacrificados por narcose com dióxido de carbono e pesados em seguida.

Procedeu-se à exposição da traqueia através de uma incisão mediana cervico-torácica que incluiu esternotomia. Afastados os planos superficiais procedeu-se à excisão da traqueia, que foi seccionada no seu topo cefálico entre o primeiro e o segundo anéis cartilagosos, e na extremidade caudal no intervalo entre os dois últimos anéis.

Após terem sido isolados, os segmentos de traqueia foram colocados num recipiente com solução de KH à temperatura ambiente, onde se procedeu à limpeza do tecido conjuntivo ainda aderente, sob ampliação com lupa.

4. Medição da força isométrica

O procedimento começou sempre pelo ajuste do zero eléctrico do sistema através do ganho do amplificador, seguido da calibração em dois pontos dos transdutores com pesos de 0.5 g e 5.5 g.

Os anéis de traqueia, com 7 a 8 milímetros (mm) de eixo longitudinal (Denis *et al.*, 2001), foram colocados no banho de órgão com 20 ml de solução de KH, arejada continuamente por 95% de O₂ e 5% de CO₂ e aquecida à temperatura de 37°C por um sistema de banho-maria (Figura 4).

No reservatório, os cilindros foram mantidos em posição ao longo do seu maior eixo e perpendicularmente ao transdutor de força isométrica entre os dois suportes de aço inoxidável. O suporte superior, móvel, foi suspenso no transdutor, estando o suporte inferior fixo ao fundo do reservatório (Figura 4).

Estiramento mecânico inicial e medição da força em repouso

Um dos métodos recomendados para uniformizar as condições basais de medição da força no MLVA consiste num estiramento mecânico com amplitude suficiente para induzir um nível de força isométrica basal em repouso, a partir do qual se obtém a resposta máxima a um agente constritor e que é designado por “comprimento óptimo de repouso” (Mitchell *et al.*, 1991; Gourgoulianis *et al.*, 1999).

Cada cilindro de traqueia foi sujeito a um estiramento inicial de 1.5g* através da rotação do micromanipulador em sentido anti-horário o que determina o afastamento do suporte superior do inferior (Figura 4). A amplitude do estiramento foi controlada pela inspeção do registo em tempo real no monitor do computador.

Seguiu-se um período de estabilização da preparação com uma duração mínima de 45 minutos durante o qual foram feitas lavagens com solução de KH de 15 em 15 minutos.

Estimulação com agentes farmacológicos

Após a estabilização da força isométrica basal, juntaram-se sucessivamente à solução concentrações crescentes de:

1. Brometo de metacolina entre 10^{-7} M e 10^{-1} M, seguida de,
2. Salbutamol entre 10^{-8} M e 10^{-2} M, seguido de,
3. Duas lavagens com solução de KH, feitas com 10 minutos de intervalo.

O intervalo mínimo de tempo entre doses sucessivas de cada agente foi de três minutos, ou o necessário para se atingir um nível de força isométrica estável.

VI. ANÁLISE DO SINAL – FORÇA ISOMÉTRICA

1. Critérios de análise

Procedeu-se à análise do sinal a partir dos dados armazenados no computador durante o procedimento experimental com o programa Axon Laboratory, versão 1.1., uma vez que, durante a fase de aquisição do sinal em tempo real, este apenas mostra a curva tempo-resposta. Este programa apresenta o registo gráfico das varia-

* Determinaram-se os valores para o comprimento óptimo usando quatro fragmentos do terço médio da traqueia de quatro animais recém-nascidos (8 a 12 dias de idade), oito com idades entre os 22 e os 39 dias e oito entre os 40 e os 60 dias. Nos animais com idade superior a 21 dias não se observaram diferenças significativas, quer na força isométrica basal, quer nos valores máximos da força induzidos por 50mM de KCl aplicando 1.0 g, 1.5 g e 2.0 g. No grupo com menos de 15 dias, o comprimento óptimo obteve-se com 1.0 g.

ções da força isométrica ao longo de toda a experiência no monitor do computador, onde se seleccionaram os intervalos relevantes através da manipulação de dois cursores (Figura 6). Para cada selecção o programa calcula: a sua duração em segundos, o valor máximo, mínimo, a média e o desvio-padrão.

2. Estabilidade do sinal

A informação disponível na literatura sobre os critérios de análise de registos de força de isométrica medida *in vitro* após a estimulação farmacológica do MLVA é praticamente inexistente. Assim, na ausência de outros critérios, considerou-se que o sinal estava estabilizado quando o desvio-padrão da força medida num dado intervalo de tempo foi igual ou inferior ao dobro do desvio-padrão do ruído eléctrico do equipamento ($0.02\text{mV} = 0.02\text{g}$). Os valores da força isométrica a partir dos quais se procedeu à análise dos resultados correspondem a (Figura 6):

Força isométrica basal – média dos últimos três minutos do período de estabilização de 45 minutos.

Força isométrica máxima (F_{max}) - média do primeiro intervalo de três minutos em contracção máxima, em que a variação do sinal foi igual ou inferior a 0.02 g.

Força isométrica mínima de relaxamento (F_{min}) – média do primeiro intervalo de três minutos em relaxamento máximo, em que a variação da força isométrica foi igual ou inferior a 0.02 g.

Todos os dados foram corrigidos para os factores calculados a partir das diferenças entre o peso aplicado e o valor medido pelo transdutor durante a calibração.

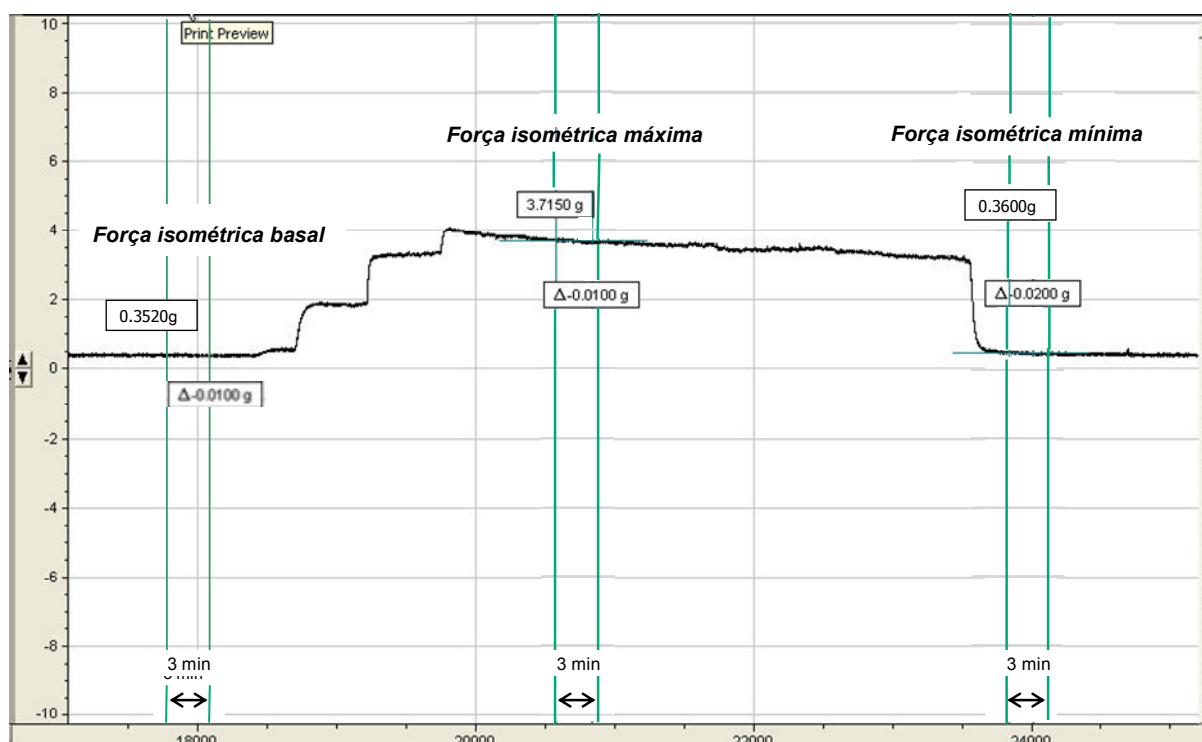


Figura 6 – Representação de um registo da variação da força isométrica durante a estimulação cumulativa com brometo de metacolina e após a indução de relaxamento máximo. A leitura dos resultados é feita no ecrã do computador através do posicionamento de dois cursores (linhas verticais na figura). O primeiro cursor dá a leitura da média da força, e o segundo o desvio padrão(Δ) num intervalo de três minutos durante o qual a variação do sinal não excede o ruído eléctrico do sistema.

3. Expressão dos resultados

A resposta à metacolina foi expressa em valor absoluto da força isométrica (g) e em percentagem de variação da força basal.

A resposta ao salbutamol e à solução de KH foram expressas em valor absoluto da força isométrica (g), e em percentagem da força máxima atingida após a administração da última concentração de metacolina ($F_{\min\%}$).

Os resultados globais de cada grupo são representados pelas curvas médias de concentração-resposta em escala semi-logarítmica.

A sensibilidade e reactividade aos agentes administrados em concentrações crescentes, metacolina e salbutamol, foram calculadas a partir de curvas de concentração-resposta em escala semi-logarítmica.

A *sensibilidade* ($EC_{50\%}$) – corresponde à potência farmacológica do agente, ou seja, a concentração que provoca 50% da resposta máxima – calculada pela equação de Hill com o programa GraphPad Prism, versão 4.0.

A *reactividade* (F_{max}) à *metacolina* – corresponde à força máxima atingida na contracção após a administração da última dose cumulativa de metacolina.

A *reactividade* (F_{min}) ao *salbutamol* – corresponde à força isométrica mínima atingida no relaxamento após a administração da última dose cumulativa de salbutamol.

VII. MÉTODOS DE ANÁLISE DOS RESULTADOS

A análise dos resultados teve como objectivos:

1. Nos grupos de controlo

- a. Determinar a sobrevivência aos quinze (grupo Controlo 15d) e aos trinta e seis dias de vida (grupo Controlo 36d).
- b. Obter os valores:
 - de controlo da força isométrica basal [F_{basal} (g)],
 - da resposta à estimulação com brometo de metacolina - $EC_{50\%}$ (M) e $F_{max\%}$ (% F_{basal}) - e com salbutamol - $EC_{50\%}$ (M) e $F_{min\%}$ (% F_{max}) e,
 - o retorno à linha de base induzido pela lavagem final com solução de KH - $F_{min\%KH}$ (% F_{max}).
- c. Avaliar as repercussões do género (machos *versus* fêmeas) sobre os parâmetros anteriores, obtendo os dados indispensáveis para optar pela utilização de amostras mistas.
- d. Avaliar as repercussões do desenvolvimento – aos 15 dias e aos 36 dias de vida - sobre os mesmos parâmetros.

2. Nos grupos experimentais

Avaliar as repercussões imediatas da exposição a 50%O₂ por quinze dias (grupo 50%O₂) e da permanência em ar ambiente por três semanas após a exposição a 50% (grupo 50%O₂+Ar) sobre:

- a. A sobrevivência e o crescimento somático dos animais.
- b. A força isométrica basal [F_{basal} (g)].
- c. A resposta contráctil por estimulação colinérgica – EC_{50%} (M) e $F_{\text{max\%}}$ (% F_{basal}) do brometo de metacolina.
- d. O relaxamento induzido por estimulação β_2 -adrenérgica – EC_{50%} (M) e $F_{\text{min\%}}$ (% F_{max}) do salbutamol.
- e. O retorno à linha de base induzido pela lavagem final com solução de KH – $F_{\text{min\%KH}}$ (% F_{max}).

Tal como nos grupos de controlo, começou-se pela análise em machos e fêmeas de todos os dados referidos nas alíneas anteriores. A análise em grupos mistos foi condicionada pela ausência de diferenças determinadas pelo género.

Métodos estatísticos

Testou-se a normalidade da distribuição de cada um dos parâmetros referidos anteriormente pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, e compararam-se as variâncias através do teste de Levene.

Quando a amostra não seguiu a distribuição normal, procedeu-se à transformação adequada dos dados de forma a poderem ser aplicados testes paramétricos na comparação entre os grupos. Foi o caso dos valores de EC_{50%} da metacolina e do salbutamol de todos os quatro grupos, que foram normalizados por transformação logarítmica.

Nos casos em que se observaram diferenças entre as variâncias, aplicou-se o método de Welch para a correcção do nível de significância (p).

A comparação entre os resultados de *animais de sexos diferentes e do efeito do desenvolvimento* foi feita pelo teste *t* de Student para amostras independentes ou, quando a dimensão (*n*) da amostra foi inferior a 13, pelo teste de Mann-Whitney. Neste último caso, os resultados foram apresentados pela mediana e pelo intervalo entre o valor mínimo e o máximo.

A *análise das repercussões imediatas da hiperóxia* obteve-se através da comparação entre o grupo experimental 50%O₂ e o de controlo com 15 dias de idade, pelo teste *t* de Student para dados não emparelhados, para todas as variáveis referidas anteriormente.

Os resultados das *repercussões da permanência em ar ambiente por três semanas* após a exposição a hiperóxia (grupo 50%O₂+Ar) foram comparados com os do grupo Controlo 36d e com o grupo experimental 50%O₂ por análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Student-Newman-Keuls e do teste *t* de Student para dados não emparelhados.

Para que fosse possível atribuir significado biológico à comparação entre os dois grupos experimentais com idades diferentes - grupo 50%O₂+Ar e grupo 50%O₂ - foi necessário excluir o efeito do desenvolvimento sobre os resultados. Assim, compararam-se os valores dos EC_{50%} da metacolina e salbutamol, F_{max%} à metacolina e F_{min%} ao salbutamol através do teste *t* de Student para dados não emparelhados.

Os resultados são apresentados pela média e respectivo desvio-padrão (média ± dp), excepto os EC_{50%} que, porque se fez a transformação logarítmica, são apresentados pela média geométrica e respectivo intervalo de confiança (95% IC).

Consideraram-se significativas diferenças em que o valor de "p" foi igual ou inferior a 0.05.

VIII. ANÁLISE MORFOMÉTRICA DA ÁREA DE MÚSCULO

A análise morfométrica do músculo liso de traqueia foi realizada nos Laboratórios Meakins-Christie da Universidade de McGill, Montreal, Canadá onde os recursos humanos e técnicos foram disponibilizados pelo seu Director, Professor Doutor James G. Martin. Estes laboratórios são o centro de investigação do aparelho respiratório da Universidade de McGill, integrando diferentes áreas, entre as quais a investigação dos mecanismos da hiperreactividade brônquica em ratos de diferentes estirpes e com larga experiência em morfometria do MLVA nesta espécie (Martin & Ramos-Barbon, 2005).

Enviaram-se traqueias dos animais dos grupos de controlo e dos dois grupos experimentais, incluídas em parafina 48 horas depois da fixação à temperatura ambiente numa solução aquosa de formaldeído a 10%. Estas amostras foram colocadas em formaldeído imediatamente após a medição da força isométrica, depois de ter sido induzido o relaxamento com salbutamol seguido de lavagem com solução de Krebs-Henseleit.

As medições foram feitas sob microscopia óptica, em secções transversais de traqueia (paralelas aos anéis cartilaginosos) com 5 μm de espessura e coradas com hematoxilina-eosina-açafrão. As lâminas foram colocadas num microscópio (Leitz Wetzlar) e as imagens projectadas no monitor de um computador onde, a partir da imagem digitalizada (interface digital Wacom tablet, Jandel Scientific, Corte Madera, CA), foram medidos o **perímetro da membrana basal** do epitélio (P_{MB}^2) e a **área de músculo** liso, com o programa de computador Sigma Scan (Jandel Scientific, Corte Madera, CA) (Florio *et al.*, 1996).

A área de músculo foi corrigida para o perímetro da membrana basal do epitélio, correspondente ao diâmetro interno da traqueia. Este procedimento corrigiu as diferenças entre as dimensões das amostras individuais e/ou erros na medição da área de músculo in-

troduzidas por distorção da preparação (Florio *et al.*, 1996; James & Carrol, 2000).

A área de músculo foi, assim, expressa em $\text{mm}^2/\text{P}_{\text{MB}}^2$ (ou área de músculo/ mm^2).

Uma vez que foi enviado um número reduzido de amostras de tecido de cada um dos grupos, que não permitiria a comparação entre machos e fêmeas, seleccionaram-se apenas traqueias de animais do sexo masculino.

Análise dos resultados

A análise dos resultados teve como objectivo avaliar as repercussões sobre a área de músculo:

- 1) do desenvolvimento pós-natal,
- 2) imediatas da exposição neonatal a 50% O_2 por quinze dias,
- e
- 3) após três semanas de recuperação em ar ambiente.

IX. HISTOLOGIA

Imediatamente após a medição da força isométrica, os cilindros de traqueia foram retirados do banho-maria e fixados numa solução aquosa de formaldeído a 10% por 48 horas, após o que foram transportados para o Departamento de Histologia, Embriologia e Biologia Celular (Director: Professor Doutor Miguel Correia) onde foram realizadas as preparações histológicas.

As peças foram incluídas em parafina e seccionadas paralelamente aos anéis cartilagosos. Os cortes foram colocados em lâminas de vidro e corados pelos métodos de Mann-Dominici e tricrómio de Masson.

A observação das preparações foi feita com um microscópio Leica DM LS2 (Leica Microsystems Ltd, Swiss) acoplado a uma câmara digital Leica 300 (Leica Microsystems Ltd, Swiss) que permitia a

visualização das imagens no monitor de um computador através do programa Adobe Photoshop, 7.0.

As preparações coradas com hematoxilina-eosina foram usadas para avaliar a integridade do epitélio da traqueia após se ter medido a força isométrica. Foi avaliada pelo menos uma amostra de cada série de quatro experiências.

A coloração de tricrómio de Masson destinou-se a avaliar as repercussões da hiperóxia e da fase de recuperação sobre a deposição de tecido conjuntivo, que cora de azul, e se distingue facilmente do músculo, que cora de vermelho.

A coloração de Mann-Dominici foi escolhida com o objectivo de identificar os mastócitos para os quais esta técnica tem uma elevada especificidade.

Análise dos resultados

As alterações da arquitectura da parede após a exposição a hiperóxia e após o período de recuperação foram avaliadas qualitativamente tendo por referência as preparações dos grupos de controlo, coradas pelos mesmos métodos.

Avaliou-se a integridade do epitélio com a objectiva de menor ampliação (5x) percorrendo todo o perímetro interno da traqueia. O critério seguido para avaliar a integridade do epitélio, foi a ausência de soluções de continuidade na membrana basal desta estrutura. Uma vez que se esperavam alterações no epitélio nas preparações dos grupos experimentais, consideraram-se para este efeito apenas os cortes com origem nos grupos Controlo 15d e Controlo 36d. Destes, observou-se pelo menos um por cada série de medições da força isométrica, onde eram monitorizadas simultaneamente traqueias de quatro animais.

Compararam-se também:

1. Nas preparações coradas com tricrómio de Masson, com as objectivas de maior ampliação, 20x, 40x e imersão, a densidade de tecido conjuntivo sub-epitelial e a presença de tecido conjuntivo entre as fibras musculares.
2. Nas preparações coradas com a coloração de Mann-Dominici e com as objectivas de maior ampliação, 40x e em imersão, a presença, densidade e localização de mastócitos na lâmina própria e na adventícia, em duas regiões da zona correspondente ao músculo – na vizinhança de uma das duas zonas de inserção na cartilagem e na parte média deste.

RESULTADOS

I. CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS DE CONTROLO

1. Avaliação da resposta à estimulação colinérgica nos grupos de controlo

Avaliou-se a resposta ao brometo de metacolina em 32 animais com 15 dias (16 machos e 16 fêmeas) e em 30 com 36 dias de idade (15 machos e 15 fêmeas).

Do grupo mais jovem, foram excluídos dois casos (1 macho e 1 fêmea) por não ter sido possível ajustar os dados à equação de cálculo do $EC_{50\%}$ (regressão sem significado estatístico e com coeficiente de determinação <0.50). Excluíram-se também um macho e uma fêmea de 36 dias por ausência de resposta à estimulação com metacolina.

1.1. Comparação entre machos e fêmeas

Os resultados da comparação da resposta à metacolina entre machos e fêmeas nos grupos de controlo de 15 dias e 36 dias de idade são apresentados na Tabela 7. A média das idades foi semelhante, sendo o peso significativamente mais baixo nas fêmeas de ambos os grupos.

Não se observaram, nos dois grupos, diferenças significativas entre as médias da $EC_{50\%}$ e da $F_{max\%}$ medidas em machos e fêmeas.

1.2. Avaliação do efeito da idade

Uma vez que não se observaram diferenças entre os sexos na resposta à estimulação com metacolina, os resultados seguintes foram analisados em conjunto.

As curvas médias de concentração-resposta dos dois grupos de controlo estão representadas na Figura 7 e mostram uma redução significativa da $F_{max\%}$ dos animais com 36 dias ($n=28$; $700\% \pm 192.7\%$) relativamente à do grupo com 15 dias de idade ($n=30$; $949\% \pm 215.4\%$).

Não se observaram diferenças significativas entre a média da $EC_{50\%}$ dos animais mais jovens ($1.3 \cdot 10^{-3}$ M, $IC_{95\%}: 1.03 \cdot 10^{-3}$ M - $1.65 \cdot 10^{-3}$ M) e a dos de 36 dias ($1.8 \cdot 10^{-3}$ M; $IC_{95\%}: 1.3 \cdot 10^{-3}$ M - $2.3 \cdot 10^{-3}$ M).

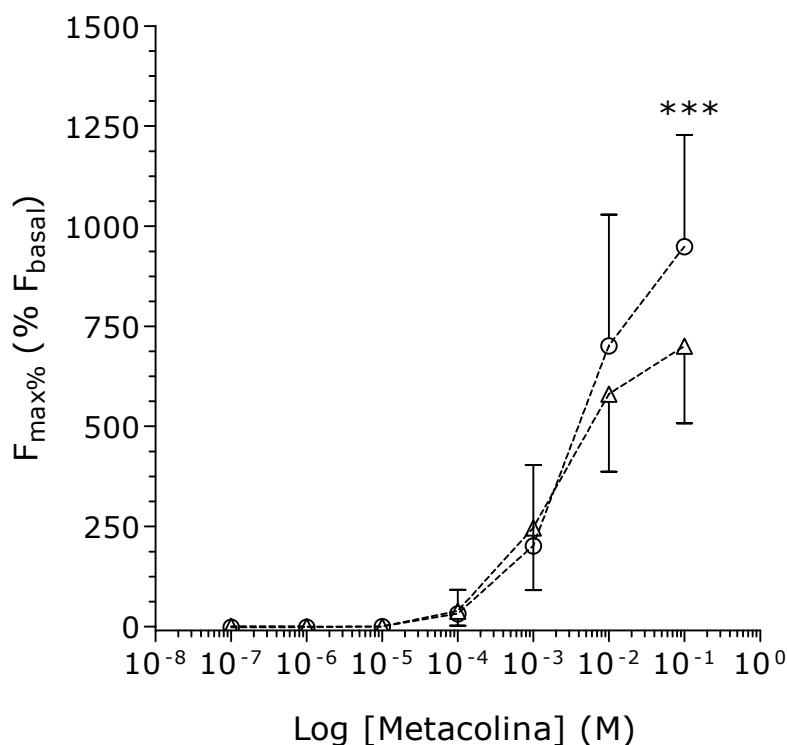


Figura 7 – Comparação entre as curvas médias de concentração-resposta ao brometo de metacolina dos grupos Controle 15d (n=30) e Controle 36d (n=28).
○ - Controle 15d, Δ - Controle 36d, ⊥ - desvio padrão da média. *** p < 0.001.

2. Avaliação da resposta ao salbutamol nos grupos de controle

Avaliou-se a resposta ao salbutamol em 20 animais com 15 dias (11 machos e 9 fêmeas) e em 15 com 36 dias de idade (8 machos e 7 fêmeas), tendo sido possível incluir na análise os dados de todos os casos.

TABELA 7 – RESPOSTA AO BROMETO DE METACOLINA NOS GRUPOS DE CONTROLO - COMPARAÇÃO ENTRE SEXOS

Grupos	CONTROLOS 15 DIAS				CONTROLOS 36 DIAS			
	Machos	p*	Fêmeas		Machos	p*	Fêmeas	
n	14	-	14		14	-	14	
Idade (dias)								
	15.3 ± 0.46	ns	15.2 ± 0.45		36.5 ± 0.52	ns	36.4 ± 0.51	
Peso (g)	35.1 ± 3.79	< 0.01	33.6 ± 3.54		154.6 ± 11.74	< 0.05	142.2 ± 16.34	
EC _{50%} (M) mg (LI - LS)	1.33*10 ⁻³ (9.22*10 ⁻⁴ - 1.92*10 ⁻³)	ns	1.29*10 ⁻³ (9.13*10 ⁻⁴ - 1.81*10 ⁻³)		1.83*10 ⁻³ (1.11*10 ⁻³ - 3.03*10 ⁻³)	ns	1.68*10 ⁻³ (1.27*10 ⁻³ - 2.24*10 ⁻³)	
F _{max%} (% F _{basal})	956.5 ± 256.90	ns	940.8 ± 310.79		700.6 ± 196.80	ns	700.1 ± 195.66	

mg. - média geométrica; IC - intervalo de confiança, LI - limite inferior, LS - limite superior. ns - p > 0.05, * teste t de Student, dados não emparelhados.

TABELA 8 – RESPOSTA AO SALBUTAMOL NOS GRUPOS DE CONTROLO – COMPARAÇÃO ENTRE SEXOS

Grupos	CONTROLOS 15 DIAS				CONTROLOS 36 DIAS			
	Machos	p*	Fêmeas		Machos	p*	Fêmeas	
n	11	-	9		8	-	7	
Idade (dias)	15.0 (15.0 - 16.0)	ns	15.0 (15.0 - 16.0)		36.0 (36.0 - 37.0)	ns	36.0 (36.0 - 37.0)	
Peso (g)	36.0 (42.0 - 33.0)	< 0.05	33.0 (29.0 - 38.0)		151.0 (136.0 - 170.0)	ns	148.0 (121.0 - 154.0)	
EC ₅₀ % (M) (min - max)	1.35*10 ⁻⁵ (6.04*10 ⁻⁶ - 6.45*10 ⁻⁵)	ns	1.93*10 ⁻⁵ (1.16*10 ⁻⁶ - 5.34*10 ⁻⁵)		> 10 ⁻²	ns	> 10 ⁻²	
F _{max} % (% F _{basal}) (min - max)	-79.0 (-64.0 - -37.0)	ns	-74.0 (-63.0 - -37.0)		-9.0 (-13.0 - -4.0)	ns	-6.0 (-12.0 - -4.0)	

min - mínimo, max - máximo; ns – p > 0.05, teste de Mann-Whitney

2.1. Comparação entre machos e fêmeas

Comparou-se a resposta ao salbutamol entre 11 machos e 9 fêmeas de 15 dias e entre 8 machos e 7 fêmeas de 36 dias. Os resultados são apresentados na Tabela 8.

Os machos do grupo Controlo 15d apresentavam um peso significativamente superior ao das fêmeas (teste de Mann-Whitney). Apesar de a mediana do peso ser inferior nas fêmeas do grupo mais velho, a diferença não foi estatisticamente significativa. Não se observaram diferenças significativas entre as $EC_{50\%}$ e $F_{min\%}$ de machos e fêmeas com 15 dias.

No grupo Controlo 36d, apenas foi possível comparar a $F_{min\%}$ que não foi diferente em machos e fêmeas. Não foi possível calcular a $EC_{50\%}$, uma vez que as variações da força isométrica foram muito reduzidas, não permitindo o cálculo através da equação de Hill.

2.2. Avaliação do efeito da idade

Tal como aconteceu com análise dos resultados da estimulação com metacolina, os resultados anteriores permitiram que a comparação fosse feita entre o conjunto dos dados de machos e fêmeas com 15 dias e o dos de 36 dias. As curvas médias de concentração-resposta dos dois grupos estão representadas na Figura 8.

No grupo com 15 dias tanto a $EC_{50\%}$ ($n=20$; $1.33 \cdot 10^{-5}$ M ($IC_{95\%}$: $6.93 \cdot 10^{-6}$ M - $2.54 \cdot 10^{-5}$ M) como a $F_{min\%}$ ($-59\% \pm 13.5\%$) foram significativamente inferiores ($p < 0.001$) às do grupo com 36 dias de idade ($n=15$), em que após a administração de 10^{-2} M se observou uma variação média da $F_{min\%}$ apenas de $-8.1\% \pm 2.90\%$.

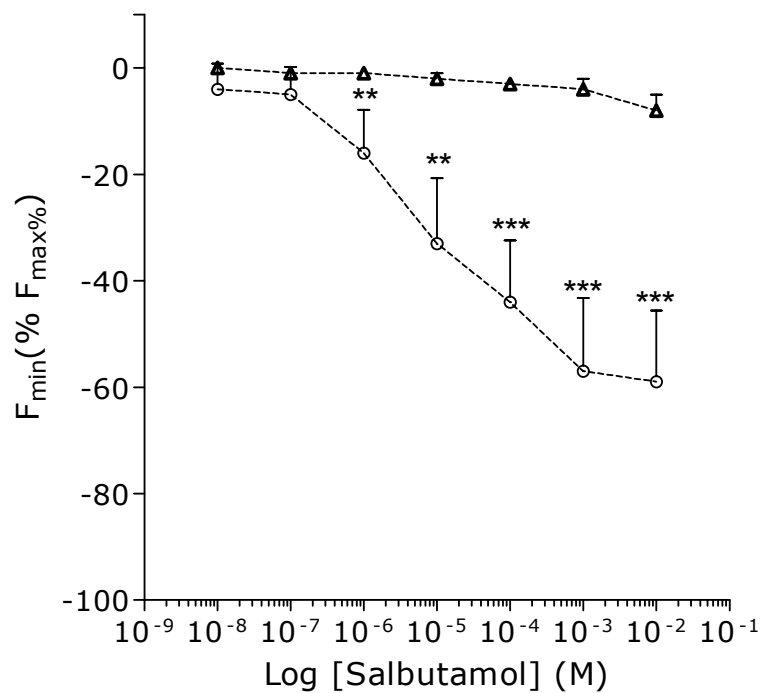


Figura 8 - Comparação das curvas médias de concentração-resposta ao salbutamol dos animais com 15 dias de idade (n=20) com as dos de 36 dias (n=15). Nos animais mais velhos apenas se observou uma redução ligeira da força isométrica após a administração de 10⁻² M.

o - Controlo 15d, Δ - Controlo 36d, ⊥ - desvio padrão da média.
 ** p < 0.01, ***p < 0.001.

II. CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

1. Sobrevivência e repercussões sobre o crescimento em machos e fêmeas

Todos os animais do grupo experimental 50%O₂ (n=32), bem como as respectivas progenitoras (n=4), sobreviveram aos quinze dias de exposição a hiperóxia.

A sobrevivência dos animais que voltaram para o ar ambiente por três semanas, até ao 36º dia de vida (n=16), foi também de 100%.

No grupo 50%O₂, a média dos pesos das fêmeas foi inferior à dos machos, não tendo atingido significado estatístico (Tabela 9).

No grupo 50%O₂ + Ar, a mediana do peso das fêmeas foi significativamente inferior à dos machos (Tabela 9).

2. Avaliação da resposta à estimulação colinérgica e β_2 -adrenérgica – comparação entre machos e fêmeas

Foi possível medir a resposta à estimulação com metacolina e ao salbutamol em 14 machos e 16 fêmeas do grupo 50%O₂ e em 8 machos e 8 fêmeas do grupo 50%O₂ + Ar (Tabela 9). Excluíram-se da análise dos resultados dois casos de cada um dos grupos experimentais, por interferências mecânicas (oscilação da preparação) durante o registo da força isométrica.

2.1 Resposta à estimulação colinérgica

Não se observaram diferenças significativas entre as EC_{50%} e F_{max%} de machos e fêmeas tanto no grupo 50%O₂ como no grupo 50%O₂ + Ar (Tabela 9).

TABELA 9 – RESPOSTA AO BROMETO DE METACOLINA E AO SALBUTAMOL NOS GRUPOS EXPERIMENTAIS COMPARAÇÃO ENTRE SEXOS

Grupos	50% O₂*			50% O₂+Ar ambiente**		
	Machos	p*	Fêmeas	Machos	p**	Fêmeas
n	14	-	16	8	-	8
Idade (dias)	15.3 ± 0.46	ns	15.2 ± 0.43	36.7 (36.0 - 37)	ns	36.4 (36.0 - 37.0)
Peso (g)	32.9 ± 1.92	ns	31.8 ± 1.25	149.7 (133.0 - 167.0)	<0.05	141.7 (129.0 - 152.0)
EC_{50%} Mch (M)	1.49*10 ⁻³ M	ns	1.66*10 ⁻³	4.39*10 ⁻⁵	ns	7.55*10 ⁻⁵
F_{max}% (% F_{basal})	(9.81*10 ⁻⁴ - 2.26*10 ⁻³) 983 ± 226.2	ns	(1.16*10 ⁻³ - 2.37*10 ⁻³) 1019 ± 209.7	(2.60*10 ⁻⁵ - 2.64*10 ⁻⁴) 1083 (830.6 - 1366.0)	ns	(2.00*10 ⁻⁵ - 1.58*10 ⁻⁴) 1060 (906.5 - 1360.0)
EC_{50%} Salb (M)	1.29*10 ⁻³ (1.05*10 ⁻³ - 1.58*10 ⁻³)	ns	1.91*10 ⁻³ (1.18*10 ⁻³ - 3.11*10 ⁻³)	5.33*10 ⁻² (3.44*10 ⁻² - 8.25*10 ⁻²)	ns	5.38*10 ⁻² (4.17*10 ⁻² - 6.34*10 ⁻²)
F_{min}% (% F_{max})	-90 ± 3.9	ns	-89 ± 6.6	-22 (-30 - -11)	ns	-22 (-33 - -14)

* teste t de Student, dados não emparelhados: média ± desvio padrão e EC_{50%} média geométrica (limite inferior - limite superior do intervalo de confiança). ** teste de Mann-Whitney; mediana (mínimo - máximo). Mch – metacolina; Salb – salbutamol

2.2 Resposta β_2 -adrenérgica

Tal como aconteceu em relação à metacolina, a $EC_{50\%}$ e $F_{min\%}$ medidas em machos e fêmeas tanto no Grupo 50%O₂ como no Grupo 50%O₂ + Ar foram semelhantes (Tabela 9).

III. AVALIAÇÃO DAS REPERCUSSÕES DA EXPOSIÇÃO A 50%O₂

Uma vez que as respostas *in vitro* ao brometo de metacolina e ao salbutamol foram semelhantes em machos e fêmeas dos grupos de controlo e que a susceptibilidade à hiperóxia avaliada pelos mesmos métodos não foi influenciada pelo sexo nos grupos experimentais, procedeu-se à avaliação das repercussões da exposição a 50% de oxigénio analisando os dados do conjunto de machos e fêmeas.

1. Caracterização dos grupos e crescimento somático

1.1. Repercussões imediatas da exposição neonatal a 50%O₂

Foi possível medir a resposta *in vitro* à estimulação com brometo de metacolina em 28 animais de ambos os sexos expostos a 50% de oxigénio nos primeiros 15 dias de vida (Tabela 10).

TABELA 10 – CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS

Grupos	Controlo 15d	50% O₂	p
n (nM, nF)	30 (15M, 15F)	28 (14M, 16F)	-
Idade (dias)	15.2 ± 0.44	15.3 ± 0.47	ns
Peso (g)	34.4 ± 3.70	31.8 ± 1.91	<0.05

n – número; M – machos; F – fêmeas; ns – p >0.05

Seleccionaram-se para o grupo de controlo animais com idades compreendidas entre os 15 dias (n=22) e os 16 dias (n=8) e com distribuição por sexos equivalente.

O grupo 50%O₂ apresentava peso médio significativamente inferior ao do grupo experimental (Tabela 10).

1.2. Repercussões da recuperação em ar ambiente após exposição neonatal a 50%O₂

Avaliou-se a resposta ao brometo de metacolina em traqueias de 16 animais que, após duas semanas de exposição neonatal a 50% de oxigénio, voltaram para o ar ambiente durante 21 dias (50% + Ar). Seleccionaram-se para o grupo de controlo 30 animais com distribuição de idades e sexos proporcional à do grupo experimental. Todos os animais do grupo experimental apresentaram um peso significativamente inferior aos do grupo de controlo (Tabela 11).

TABELA 11 – CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS

Grupos	Controlo 36 d	50% O₂+Ar	p
n (nM, nF)	30 (15M, 15F)	16 (8M, 8F)	-
Idade (dias)	36.2 ± 0.42	36.4 ± 0.42	ns
Peso (g)	147.6 ± 15.54	135.4 ± 18.32	<0.05

n – número; M – machos; F – fêmeas; ns – p > 0.05, teste t Student

2. Força isométrica basal

Não se observaram diferenças significativas (ANOVA, p - ns) entre as médias da força isométrica basal (F_{basal}) dos grupos de Controlo

15d ($0.41 \text{ g} \pm 0,074 \text{ g}$), Controlo 36d ($0.38 \text{ g} \pm 0.05 \text{ g}$) e os grupos experimentais $50\%O_2$ ($0.38 \text{ g} \pm 0.075 \text{ g}$) e $50\%O_2 + \text{Ar}$ ($0.36 \text{ g} \pm 0.03 \text{ g}$).

3. Resposta à estimulação colinérgica

3.1. Repercussões imediatas da exposição neonatal a $50\%O_2$

As curvas médias de concentração-resposta do grupo experimental $50\%O_2$ e do grupo de controlo da mesma idade foram praticamente sobreponíveis em todos os pontos (Figura 9).

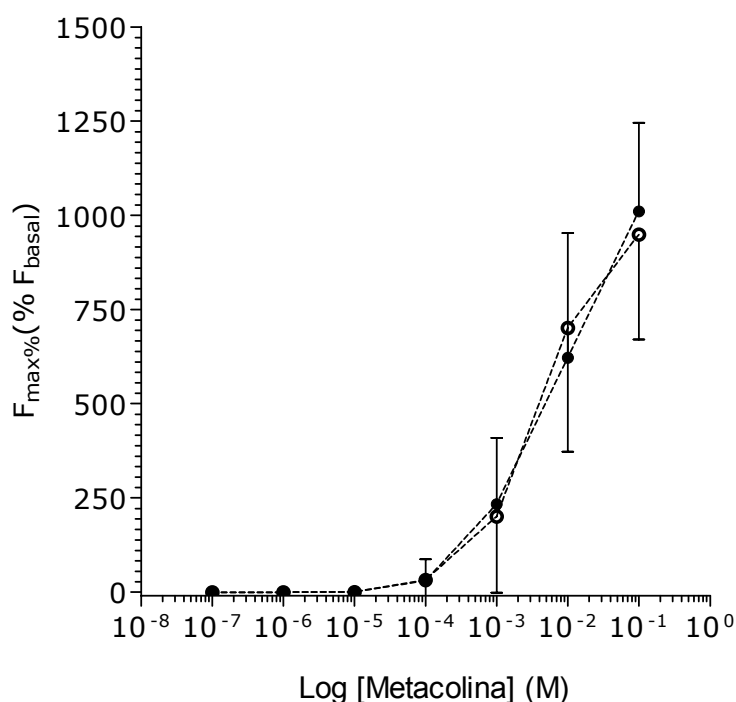


Figura 9 - Comparação entre as curvas médias de concentração-resposta ao brometo de metacolina do grupo exposto a hiperóxia neonatal por duas semanas (n=30) e do grupo controlo com 15 dias de idade (n=28).

• - $50\% O_2$ e o - controlo, \perp - desvio padrão da média.

Sensibilidade (Figura 10)

Não se observaram diferenças significativas entre a $EC_{50\%}$ dos animais expostos a 50% de oxigênio ($1.6 \cdot 10^{-3}$ M, $IC_{95\%}$: $1.21 \cdot 10^{-3}$ - $2.03 \cdot 10^{-3}$ M) e a do grupo Controlo 15d ($1.3 \cdot 10^{-3}$ M, $IC_{95\%}$: $1.03 \cdot 10^{-3}$ M - $1.65 \cdot 10^{-3}$ M).

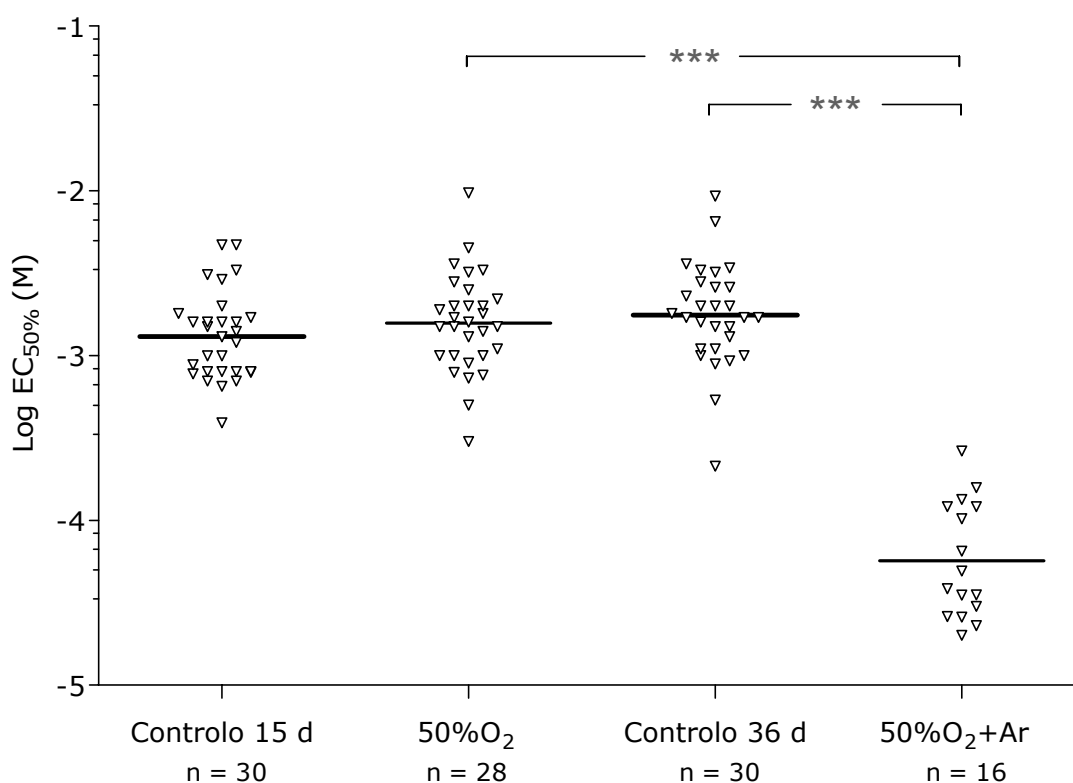


Figura 10 - Representação dos valores individuais das $EC_{50\%}$ de metacolina (▽) e das respectivas médias geométricas (—) nos grupos experimentais e nos grupos de controlo. O grupo 50%O₂+Ar apresentou valores significativamente inferiores (***) p 0.001 ANOVA) ao do seu grupo de controlo (Controlo 36d) e ao avaliado imediatamente após 15 dias de exposição a hiperóxia (50%O₂). Não se observaram diferenças entre os dois grupos de controlo.

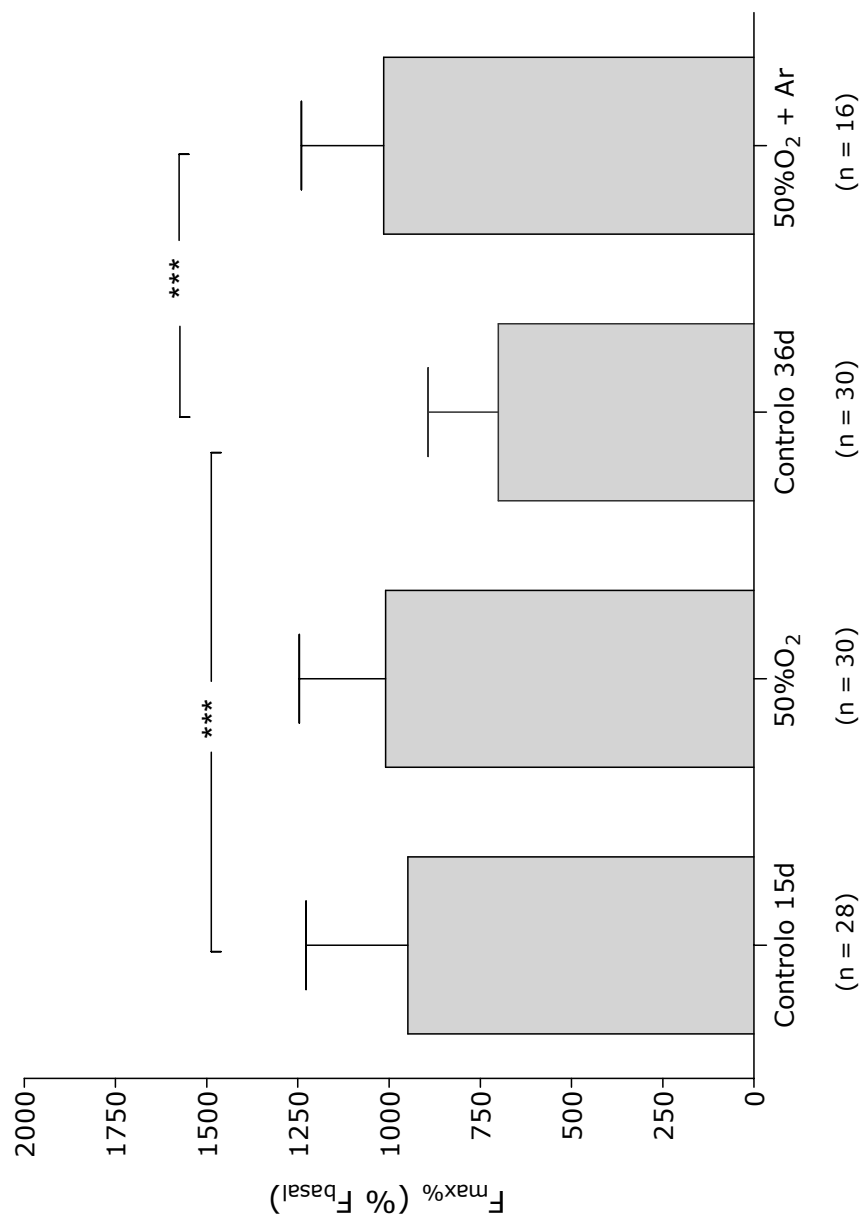


Figura 11 - Comparação das médias da $F_{max\%}$ entre os grupos experimentais e os grupos de controlo. O grupo 50%O₂ + Ar apresentou valores significativamente superiores aos do seu grupo de controlo e ao grupo avaliado imediatamente após a exposição a hiperóxia. A $F_{max\%}$ do grupo de controlo com 36 dias foi a mais baixa dos quatro grupos (***) $p < 0.001$, ANOVA).

Reatividade (Figura 11)

A média da $F_{\max\%}$ do grupo experimental ($1010 \pm 278.6\%$) não foi significativamente diferente da do grupo Controlo 15d ($949\% \pm 215.4\%$).

3.2. Repercussões da recuperação em ar ambiente após exposição neonatal a 50%O₂

A curva de concentração-resposta do grupo 50%O₂ + Ar apresentou um desvio para a esquerda relativamente ao grupo de controlo da mesma idade (Figura 12).

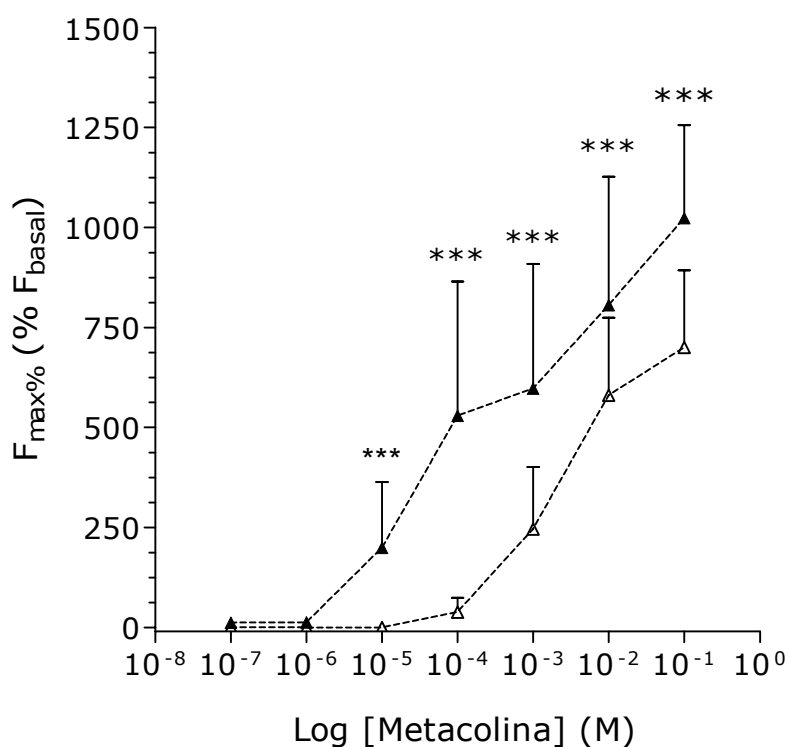


Figura 12 - Comparação entre as curvas médias de concentração-resposta ao brometo de metacolina do (▲) grupo 50%O₂ + Ar (n=16) e do (△) grupo de controlo com 36 dias de idade (n=30). A variação da força isométrica no grupo experimental foi superior à do grupo de controlo em todas as concentrações $\geq 10^{-6}$ M. \perp - desvio padrão da média. (***) $p < 0.001$.

Sensibilidade (Figura 10)

A média geométrica da $EC_{50\%}$ do grupo 50%O₂ + Ar ($5.7 \cdot 10^{-5}$ M, $IC_{95\%}$: $3.7 \cdot 10^{-5}$ M - $8.7 \cdot 10^{-5}$ M) foi significativamente inferior ($p < 0.001$, ANOVA) à do seu grupo de controlo de 36 dias ($1.8 \cdot 10^{-3}$ M, $IC_{95\%}$: $1.3 \cdot 10^{-3}$ M - $2.3 \cdot 10^{-3}$ M) e também à do grupo avaliado imediatamente após 15 dias em hiperóxia.

Reactividade (Figura 11)

Três semanas após a exposição a 50% de O₂, observou-se um aumento significativo da média da $F_{max\%}$ ($1014\% \pm 225.4$), ($p < 0.001$, ANOVA), relativamente ao grupo de controlo da mesma idade ($700\% \pm 192.7\%$). A média deste último foi também significativamente inferior aos animais do grupo de controlo mais jovem ($p < 0.001$, ANOVA).

4. Resposta à estimulação β_2 -adrenérgica

4.1. Repercussões imediatas da exposição neonatal a 50%O₂

Avaliou-se a resposta ao salbutamol nos 30 animais expostos a 50%O₂ por 15 dias e num subgrupo de 20 dos controlos de 15 dias. O grupo experimental apresentava um peso significativamente inferior ao do grupo de controlo (Tabela 12).

TABELA 12 – CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS

Grupos	Controlo 15 d	50% O₂	p
n (nM, nF)	20 (11M, 9F)	30 (15M, 15F)	-
Idade (dias)	15.2 ± 0.38	15.3 ± 0.47	ns
Peso (g)	34.4 ± 3.70	32.1 ± 1.94	< 0.05

n – número; M – machos; F – fêmeas; ns – p > 0.05

A curva média de concentração-resposta do grupo experimental apresentou um desvio para a esquerda relativamente à do grupo de controlo (Figura 13).

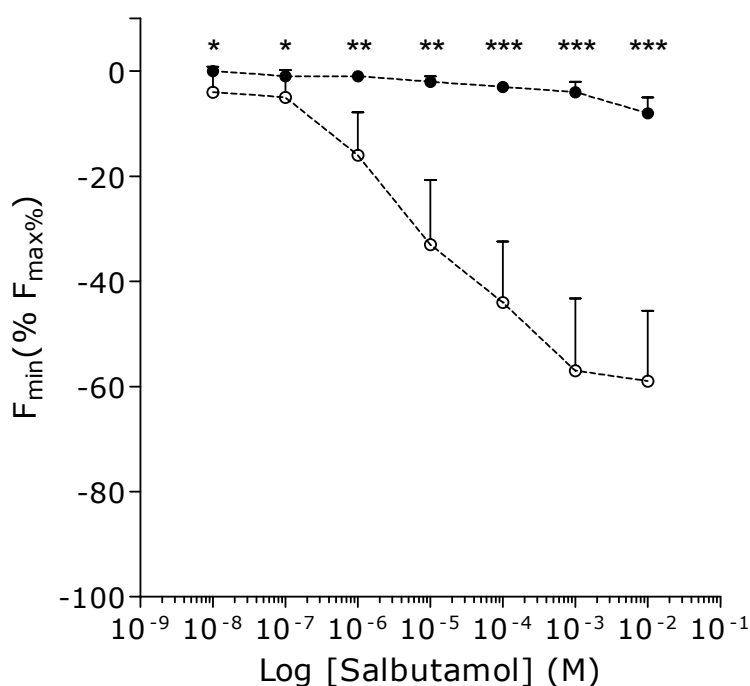


Figura 13 - Comparação entre as curvas médias de concentração-resposta ao salbutamol do grupo 50%O₂ (n=30) e do grupo controlo com 15 dias de idade (n=20). Os valores da força mínima de relaxamento foram inferiores ao do grupo de controlo em todas as concentrações (* p < 0.05, ** p < 0.01, ***p < 0.001).

• - 50% O₂ e o - controlo, ⊥ - desvio padrão da média.

Reatividade (Figura 13)

A $F_{\min\%}$ do grupo experimental ($-89\% \pm 5.4\%$) foi significativamente mais baixa ($p < 0.0001$) que a do grupo de controlo ($-59\% \pm 3.5\%$).

Sensibilidade (Figura 14)

A média geométrica da $EC_{50\%}$ do grupo experimental, $9.78 \cdot 10^{-8}$ M ($IC_{95\%}$: $4.99 \cdot 10^{-8}$ M - $1.92 \cdot 10^{-7}$ M), foi significativamente inferior ($p < 0.01$) à média do grupo de controlo, $1.33 \cdot 10^{-5}$ M ($IC_{95\%}$: $6.93 \cdot 10^{-6}$ M - $2.54 \cdot 10^{-5}$ M).

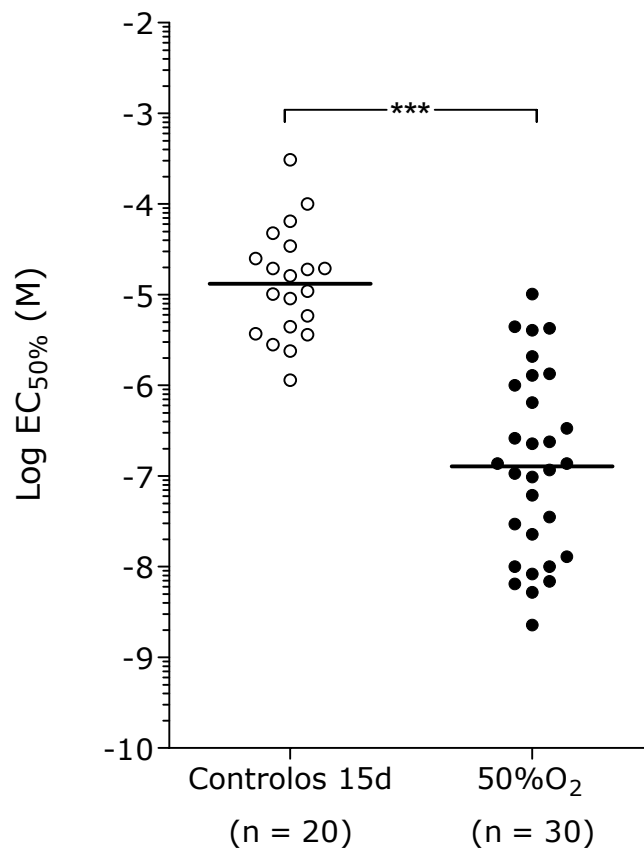


Figura 14 - Efeito da exposição neonatal a 50% O₂ por duas semanas sobre a concentração eficaz ($EC_{50\%}$) de salbutamol. Representação dos valores individuais das $EC_{50\%}$ dos grupos experimental (•), de controlo (o) e das respectivas médias geométricas (—); *** $p < 0.001$.

4.2. Repercussões da recuperação em ar ambiente após exposição neonatal a 50%O₂

Foi possível avaliar a resposta ao salbutamol em 16 dos animais do grupo experimental 50%O₂ + Ar e compará-lo com 15 controlos com a mesma idade, apresentando os primeiros uma redução significativa do peso, de acordo com o grupo original a que pertencem (Tabela 13).

TABELA 13 – CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS

Grupos	Controlo 36 d	50% O₂+Ar	p
n (nM, nF)	15 (8 M, 7 F)	16 (8 M, 8 F)	-
Idade (dias)	36.0 ± 0.00	36.2 ± 0.40	ns
Peso (g)	149.1 ± 15.92	135.6 ± 18.02	<0.05

n – número; M – machos; F – fêmeas; ns – p > 0.05, teste t Student

Sensibilidade

O grupo experimental 50%O₂ + Ar (9.78*10⁻⁸ M, IC_{95%}: 4.99*10⁻⁸ M - 1.92*10⁻⁷ M) apresentou maior sensibilidade que o grupo de controlo. Neste, o cálculo da EC_{50%} de salbutamol através da equação de Hill não foi possível, uma vez que a relação concentração-resposta só se afastou ligeiramente da horizontal a partir de 10⁻² M (Figura 14).

Reactividade

No grupo de controlo, não se observaram variações da F_{max%} até à concentração de 10⁻² M que apenas induziu uma redução média

de $8.1\% \pm 2.90\%$, significativamente inferior à do grupo experimental que foi de $-28.4\% \pm 5.70\%$ (Figura 15).

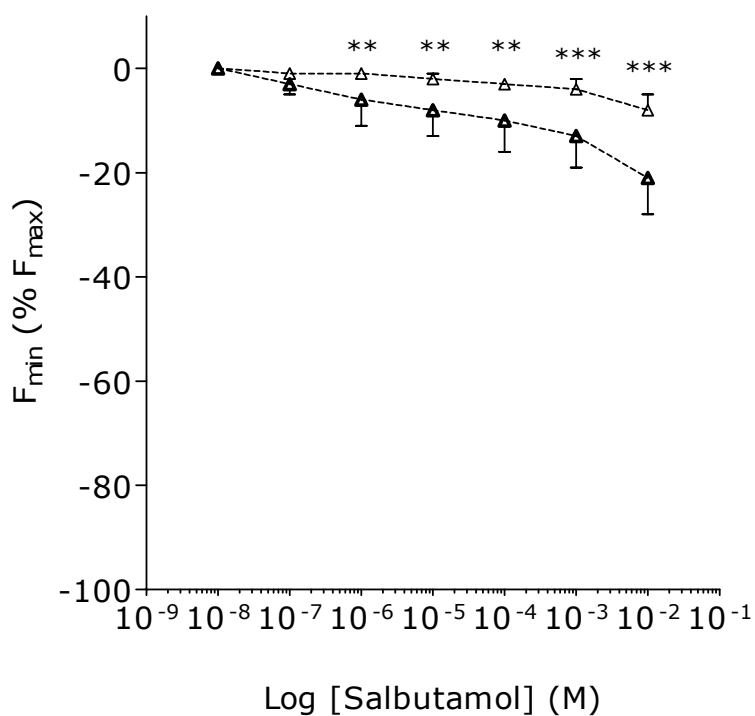


Figura 15 - Comparação entre as curvas médias de concentração-resposta ao salbutamol do grupo 50% O_2 + O_2 (n=16), do grupo controlo com 36 dias de idade (n=16). Os valores da força mínima de relaxamento foram inferiores aos do grupo de controlo. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). (●) - 50% O_2 e (○) - controlo, \perp - desvio padrão da média.

IV. AVALIAÇÃO DAS REPERCUSSÕES MORFOLÓGICAS DA EXPOSIÇÃO NEONATAL A 50% O₂

1. Análise morfométrica do MLT

A análise morfométrica da área de músculo foi feita em subgrupos dos grupos iniciais com n entre cinco e sete elementos, pelo que a análise estatística foi feita pelo teste de Mann-Whitney. Seleccionaram-se apenas amostras de traqueia de machos, uma vez que o género do animal poderia ser um factor de variação das dimensões do MLT.

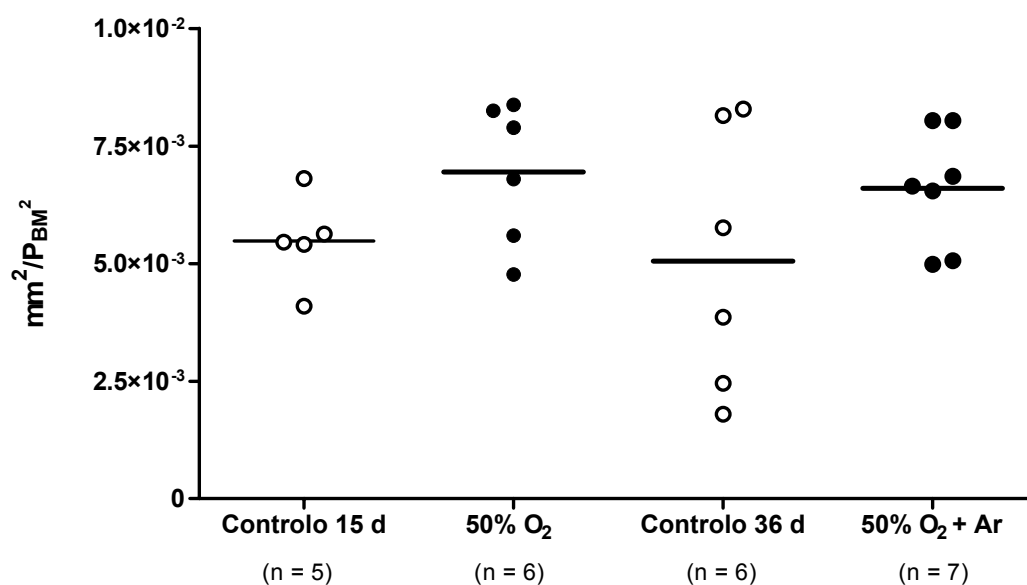


Figura 16 – Valores individuais e medianas da área de músculo ($\text{mm}^2/\text{P}_{\text{BM}}^2$) da traqueia dos grupos de controlo (o) e dos grupos experimentais (•). Apesar de as medianas serem superiores relativamente aos grupos de controlo imediatamente após a exposição à hiperóxia e no fim do período de recuperação, não se observaram diferenças estatisticamente significativas (teste de Mann-Whitney: ns).

**TABELA 14 – COMPARAÇÃO DA ÁREA DE MÚSCULO ENTRE OS GRUPOS EXPERIMENTAIS E OS GRUPOS DE CONTROLO DA MESMA IDADE
REPERCUSSÕES DA EXPOSIÇÃO A 50%O₂ DURANTE 15 DIAS E DO PERÍODO DE RECUPERAÇÃO EM AR AMBIENTE**

Grupos	Controlo 15d	P	50%O₂	Machos	p	50%O₂+Ar ambiente
n	5	-	6	6	-	7
Idade (dias)	15.0	-	15.0	36.0	-	36.0
Peso (g)	34.0 (33.0 – 35.0)	ns	32.0 (31.0 – 33.0)	148.5 (146.0 – 150.0)	<0.05	135.0 (133.0 – 140.0)
AM (mm²/P_{MB}²)	5.46*10 ⁻³ (4.10*10 ⁻³ – 6.81*10 ⁻³)	ns	7.34*10 ⁻³ (4.77*10 ⁻³ – 8.38*10 ⁻³)	4.81*10 ⁻³ (1.80*10 ⁻³ – 8.28*10 ⁻³)	ns	6.65*10 ⁻³ (4.98*10 ⁻³ – 8.04*10 ⁻³)

* teste de Mann-Whitney: mediana (mínimo - máximo); AM – área de músculo; ns – p > 0.05

1.2. Efeito da idade

Nestas amostras, a área de músculo não variou com a idade, já que não se observaram diferenças significativas entre as medianas do grupo Controlo 15d e do grupo Controlo 36d. Este último apresentou a maior amplitude de variação entre os valores máximos e mínimos dos quatro grupos analisados (Tabela 14).

1.3. Repercussões da exposição a 50% O₂

Não se observaram diferenças significativas entre o grupo Controlo 15d e o grupo 50%O₂ (Tabela 12), apesar de três dos seis casos do grupo experimental terem áreas superiores à maior área do grupo de controlo (Figura 14).

1.4. Repercussões da recuperação em ar ambiente após a exposição a 50%O₂

Apesar de a mediana da área de músculo do grupo 50% O₂ + Ar ser superior à do grupo de Controlo 36d, a diferença não teve também significado estatístico.

2. Histologia

Foi possível fazer a avaliação da integridade do epitélio e das repercussões estruturais da exposição ao oxigénio e do período de recuperação em seis amostras do grupo Controlo 15 d, em quatro do grupo Controlo 36 d e em cinco amostras dos grupos experimentais 50%O₂ e 50%O₂ + Ar. Apresentam-se repro fotográficas

As imagens que a seguir se apresentam são representativas de cada um destes grupos.

2.1. Integridade do epitélio

Na figura 17 apresentam-se duas imagens de cortes transversais de traqueias dos grupos Controlo 15d (A) e Controlo 36d (B) corados com hematoxilina-eosina, com objectiva de 5x.

Não se observaram soluções de continuidade envolvendo o epitélio, a cartilagem ou o músculo (Figura 17), resultantes da manipulação das traqueias ou das condições em que permaneceram durante a medição da força isométrica, tal como já foi mencionado em “Métodos”. O músculo, ocupava o terço posterior da traqueia (Figura 17 - B), sendo esta relação semelhante nos animais de 15 dias de idade e nos de 36 dias. Apesar de, nestes últimos, os diâmetros da traqueia aparentarem ser superiores (Figura 17), o diferente grau de distorção das preparações não permite uma comparação qualitativa com qualquer precisão.

A separação do epitélio e da lâmina própria das estruturas subjacentes em alguns pontos do perímetro, visível na maior parte das preparações, foi consequência do corte com o micrótomo e deve-se à diferente resistência da cartilagem relativamente aos tecidos adjacentes.

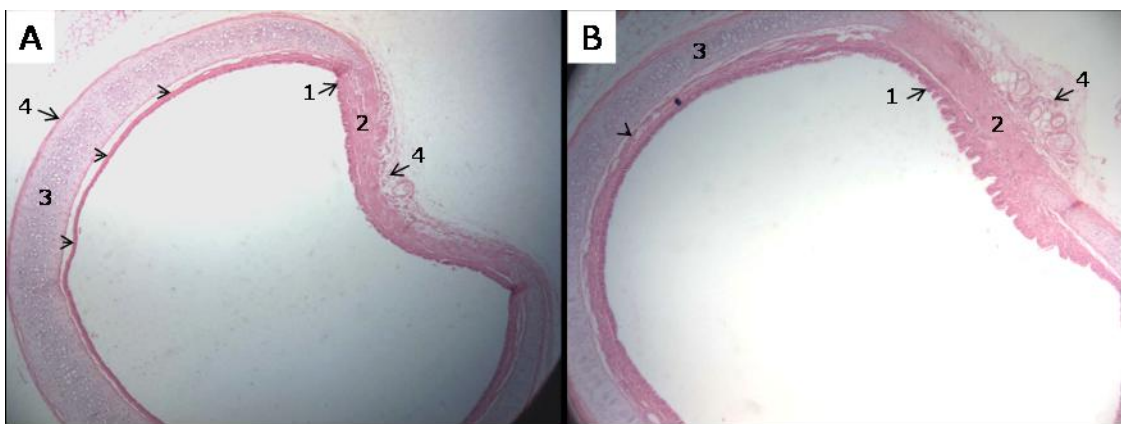


Figura 17 – Cortes transversais de traqueias coradas com Hematoxilina-Eosina, em objectiva de 5x, de um animal do grupo Controlo 15d (A) e do grupo Controlo 36d (B). 1 – Epitélio e lâmina própria; 2 – Músculo traqueal; 3 – Cartilagem hialina; 4 – Adventícia. As pontas de seta (>) assinalam as zonas de afastamento entre o conjunto epitélio+lâmina própria da cartilagem hialina resultante do corte com o micrótomo (Trabalho realizado no extinto Serviço de Neuropatologia do Hospital de Sto António dos Capuchos)

2.2. Tecido conjuntivo e músculo – Coloração de tricrómio de Masson

2.2.1. Grupos de Controlo

Com a coloração de tricrómio de Masson, verificou-se que a distribuição do músculo liso e do tecido conjuntivo da adventícia da traqueia dos grupos de controlo era idêntica, com excepção da lâmina própria que tinha maior espessura no grupo mais velho (Controlo 36d). A adventícia, constituída por tecido conjuntivo com menor densidade de fibras que a lâmina própria, estruturas vasculares de diferentes calibres e núcleos celulares fusiformes, de grandes dimensões, correspondentes a fibroblastos (Figura 18).

Relativamente ao músculo traqueal, ocupava o terço médio da parede e era constituído por células dispostas paralelamente entre si, não foram aparentes diferenças entre os dois grupos, quer na disposição relativa, quer na densidade de células musculares.

2.2.2. Repercussões da exposição a 50%O₂

Nas preparações de traqueia dos animais do grupo 50%O₂ observou-se, um aumento da espessura do tecido conjuntivo da submucosa e da adventícia relativamente às preparações dos controlos da mesma idade, em particular na vizinhança do músculo. Como se pode ver nas figuras 18 e 19, este aumento fez-se à custa de material predominantemente não fibrillar e não celular da matriz extracelular.

Apesar de estes aspectos terem sido semelhantes em todas as preparações do grupo 50%O₂, a sua quantidade e orientação espacial dos componentes da matriz foram muito variáveis de animal para animal (Figura 19). Nalguns casos o aumento da matriz extracelular limitou-se à lâmina própria e adventícia (Figura 19, B1), enquanto noutros – três dos cinco observados - chegou mesmo a ocupar os

espaços entre as células musculares provocando, em alguns pontos, interrupções na continuidade do músculo (Figura 19, B2 e B3).

2.2.3. Repercussões do período de recuperação em ar ambiente

A diferença mais evidente no grupo 50%O₂ + Ar, relativamente às alterações morfológicas observadas imediatamente após a exposição a hiperóxia, foi a redução do tecido conjuntivo da lâmina própria e da adventícia, onde se observaram apenas fibroblastos numa rede de tecido conjuntivo laxo (figura 18, B e D). Este aspecto a foi também diferente do grupo Controlo 36d, onde a lâmina própria apresentava maior espessura e densidade (Figura 18, C e D).

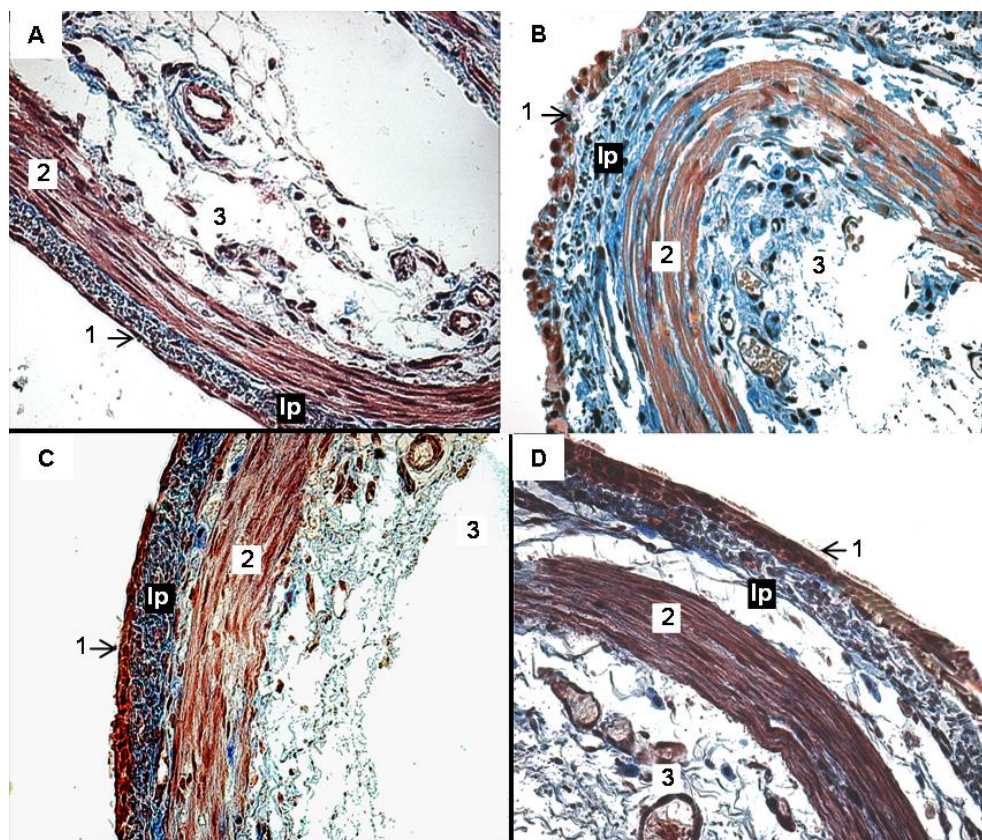


Figura 18 – Cortes transversais de traqueias de animais dos grupos Controlo 15d (A), 50%O₂ (B), Controlo 36d (C) e 50%O₂ + Ar (D) corados com tricrómio de Masson, sob objectiva de 40x. 1 – Epitélio; 2 – Músculo traqueal; 3 – Adventícia; lp – lâmina própria. Em B a espessura do tecido conjuntivo na lâmina própria e na adventícia foi superior à do grupo de controlo da mesma idade. São também visíveis fibras coradas de azul dispostas paralelamente às células musculares e entre as células musculares. Após a recuperação em ar ambiente (D), a lâmina própria apresenta menor densidade que no grupo Controlo 36d (C).

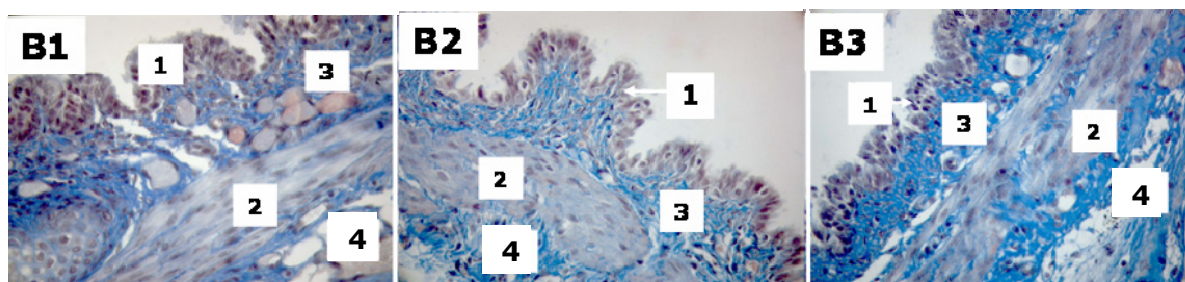


Figura 19 – Cortes transversais de traqueias de três animais do Grupo 50%O₂ corados por tricômio de Masson, sob objectiva de 40x, onde se observam diferentes graus de deposição de tecido conjuntivo na lâmina própria (3) e na adventícia (4) e na vizinhança do músculo traqueal (2). Em B1 limita-se praticamente à periferia do músculo (2); em B2 e B3 este aspecto tem maior exuberância, provocando o aumento da espessura da lâmina própria e da adventícia (3 em B2) e dispondo-se entre as células musculares, aspecto particularmente evidente em B3.

2.3. Mastócitos – Coloração de Mann-Dominici

A opção por esta coloração surgiu na sequência dos resultados das preparações coradas com hematoxilina-eosina dos dois grupos experimentais, onde, à semelhança dos grupos de controlo, não se encontraram células inflamatórias (neutrófilos e ou eosinófilos).

Uma vez que existiam referências à presença de mastócitos em modelos de hiperóxia, pretendeu-se avaliar se estas células estavam presentes nos grupos de controlo e se os procedimentos experimentais induziam alteração na sua quantidade e/ou localização.

2.3.1. Distribuição dos mastócitos nos grupos de controlo

Nos grupos Controlo 15d e 36d, observaram-se mastócitos no tecido conjuntivo da lâmina própria e da adventícia vizinhas do músculo traqueal, em particular na zona de inserção com a cartilagem hialina (Figura 20).

Não se observaram imagens de desgranulação dos mastócitos em nenhum dos casos analisados.

2.3.2. Repercussões da exposição a 50%O₂

No grupo 50%O₂, encontraram-se mastócitos com localização semelhante à dos grupos de controlo, mas em maior número (Figura 20, C). Um aspecto característico deste grupo foi a presença de imagens de desgranulação destas células (Figura 21, C1). Numa das preparações observou-se ainda uma estreita relação de contiguidade entre os mastócitos e os capilares da lâmina própria e da adventícia (Figura 21, C2).

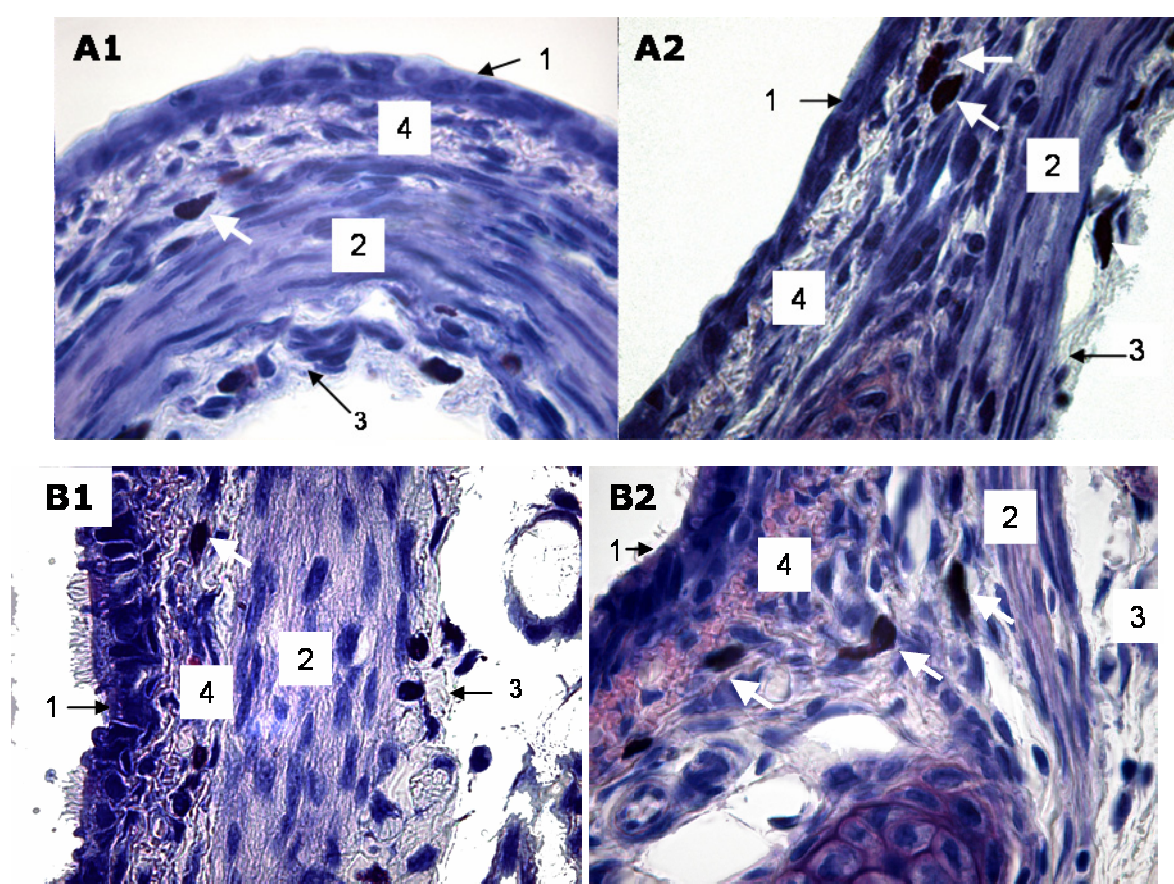


Figura 20 – Distribuição dos mastócitos em traqueias dos grupos Controlo 15d e 36d, na lâmina própria (4) e adventícia (3) vizinhas do músculo traqueal (2), com coloração de Mann-Dominici em imersão. Em A1 e A2 – parte média da região posterior na traqueia – observam-se um mastócito (seta branca) na lâmina própria e um na adventícia; em B1 e B2 – na zona de inserção do músculo traqueal (2) na cartilagem os mastócitos foram mais numerosos (setas brancas), localizando-se exclusivamente no tecido conjuntivo vizinho do músculo (3 e 4).

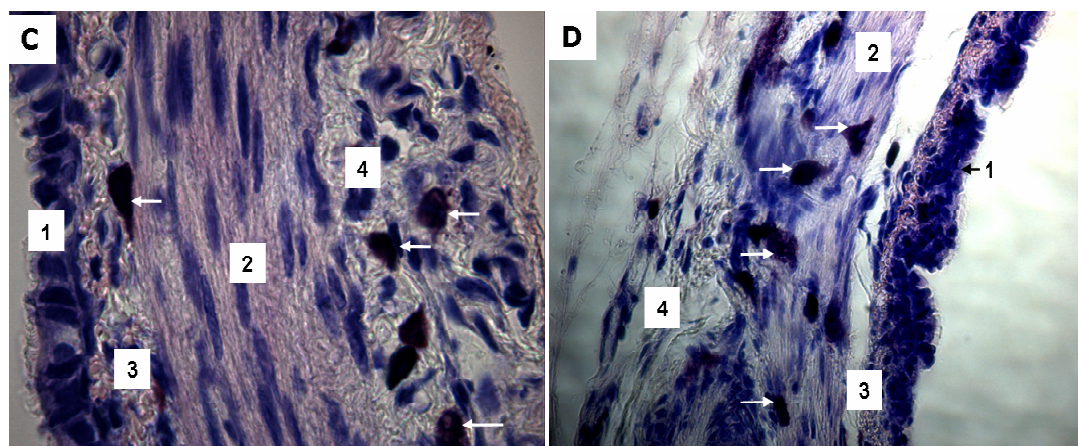


Figura 21 – Distribuição dos mastócitos em traqueias dos grupos 50%O₂ (C) e 50%O₂ + Ar (D), com coloração de Mann-Dominici (objectiva 40x, em imersão). Em C – parte média da região posterior na traqueia, observou-se um aumento do número de mastócitos (setas brancas), que no grupo 50%O₂ + Ar (D), se localizavam em maior contiguidade com o músculo traqueal (2). 1 – epitélio.

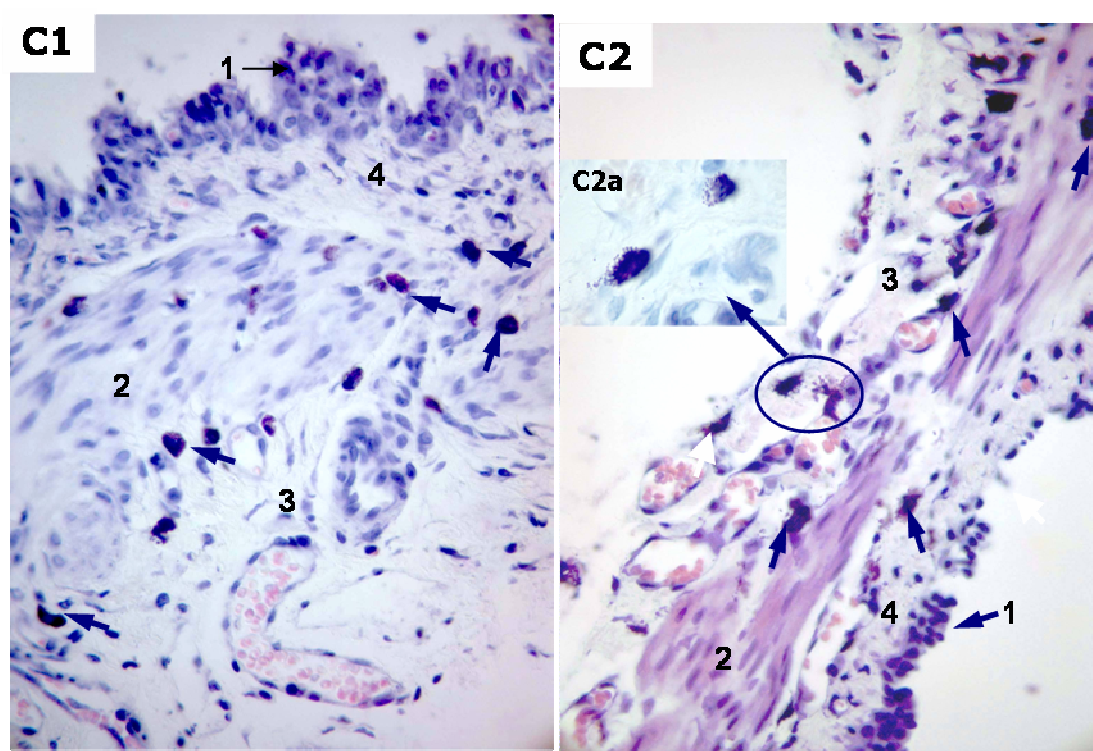


Figura 22 – Efeitos imediatos da hiperóxia (C1 e C2) sobre os mastócitos em duas traqueias. Observou-se um aumento da infiltração de mastócitos (setas pretas) com coloração de Mann-Dominici (objectiva 40x) na vizinhança do músculo (2) e na adventícia (3). Em C2 observaram-se mastócitos localizados em maior contiguidade com o músculo traqueal. Em imersão eram visíveis imagens compatíveis com desgranulação dos mastócitos (C2a).

2.3.3. Repercussões do período de recuperação em ar ambiente

No grupo 50%O₂ + Ar não se observaram diferenças qualitativamente significativas no número dos mastócitos relativamente ao grupo 50%O₂. Encontrou-se, no entanto maior densidade destas células sobrepostas ao músculo na vizinhança da zona de inserção com a cartilagem, apresentando também sinais de desgranulação (Figura 21, D).

DISCUSSÃO

Demonstrou-se, em ratos Wistar recém-nascidos, que a exposição crónica a hiperóxia moderada, em níveis que se aproximam dos que actualmente se administram no humano, induz não só o aumento da contractilidade do MLT em resposta à estimulação colinérgica *in vitro*, como o aumento do relaxamento induzido pelo salbutamol (Denis *et al.*, 2001; Fayon *et al.*, 2002). **Desconhecia-se, no entanto, se as alterações induzidas neste modelo crónico tinham repercussões funcionais e/ou morfológicas a longo prazo.**

O objectivo deste trabalho foi, assim, avaliar as **repercussões crónicas da exposição prolongada à hiperóxia neonatal moderada sobre a contractilidade do músculo liso e a arquitectura das vias aéreas.**

Para tal, sujeitaram-se ratos Wistar recém-nascidos a 50% de O₂ durante duas semanas seguindo-se um período de três semanas de recuperação em ar ambiente.

Começou-se por caracterizar a resposta *in vitro* do MLT à estimulação colinérgica e β_2 -adrenérgica em machos e fêmeas dos grupos de controlo, aos 15 e 36 dias de vida, uma vez que não existiam dados na literatura sobre os valores normais das respostas em fases tão precoces do desenvolvimento como as que foram usadas neste trabalho. Não se observaram diferenças significativas nas respostas à metacolina e ao salbutamol entre machos e fêmeas nas duas fases do desenvolvimento estudadas. Demonstrou-se também que a EC_{50%} de metacolina não apresentava variações significativas entre os 15 e os 36 dias de vida, mas que a força isométrica máxima se reduzia com a idade.

Relativamente à resposta à estimulação β_2 -adrenérgica, verificou-se que o salbutamol induzia maior relaxamento nos animais de 15 dias. Na análise quantitativa do MLT, não foram encontradas dife-

renças significativas na área de MLT entre os animais mais jovens e os mais velhos. A observação em microscopia óptica de cortes transversais das traqueias, as mesmas usadas nas medições *in vitro* da força isométrica, permitiu garantir que os resultados funcionais não tinham sido alterados pela manipulação.

A exposição durante duas semanas a 50%O₂ foi compatível com a vida de todas as fêmeas adultas. Ao contrário dos animais recém-nascidos e jovens, as taxas de mortalidade entre os ratos adultos sujeitos à hiperóxia são muito elevadas. Assim, este aspecto foi determinante para a viabilidade do protocolo, por permitir a exposição simultânea da mãe e da ninhada antes da data do desmame, que ocorre aos 21 dias.

Após 15 dias de hiperóxia, a resposta *in vitro* do MLT à estimulação colinérgica não se modificou relativamente aos controlos da mesma idade, mas observou-se um aumento significativo do relaxamento induzido pelo salbutamol. Verificou-se também um aumento da área de músculo nas seis amostras de traqueia analisadas, mas sem significado estatístico, provavelmente porque a dimensão das amostras foi insuficiente para a variabilidade observada entre as medições individuais. A hiperóxia induziu o aumento da espessura da matriz extracelular e da densidade de mastócitos desgranulados, que se localizaram, preferencialmente, na vizinhança do músculo liso.

Depois de três semanas de recuperação em ar ambiente, no grupo 50%O₂ + Ar, a sensibilidade à estimulação colinérgica aumentou significativamente relativamente ao grupo Controlo 36d, sem variação da força isométrica máxima. Também a resposta à estimulação com salbutamol após o período de recuperação foi superior à observada no grupo de controlo da mesma idade. Observou-se, ainda, o aumento da área de MLT e da densidade de mastócitos desgranulados relativamente aos controlos.

Quando comparada com as alterações observadas no grupo 50%O₂, o aumento da espessura da matriz extracelular no grupo 50% O₂ + Ar reduziu-se e os mastócitos passaram a localizar-se em maior contiguidade com o MLT.

Os presentes resultados traduzem os acontecimentos em dois tempos predeterminados: após duas semanas da exposição crónica à hiperóxia moderada e após 21 dias de recuperação em ar ambiente. Demonstrou-se com este modelo que a hiperóxia moderada pode provocar alterações funcionais da resposta do músculo liso à estimulação colinérgica, que só se tornam evidentes semanas após o estímulo ter cessado. Considera-se este aspecto particularmente importante, **uma vez que identifica a hiperóxia moderada neonatal como um potencial factor de risco isolado para a hiperreatividade brônquica (HRB) persistente observada na puberdade e adolescência de crianças nascidas prematuras** (Halvorsen *et al.*, 2005), onde estudos longitudinais encontraram uma relação significativa da HRB com a oxigenioterapia neonatal (Mai *et al.*, 2003; Halvorsen *et al.*, 2004).

I. GRUPOS DE CONTROLO

1. Comparação da força isométrica entre machos e fêmeas – valores basais e das respostas à estimulação colinérgica e β_2 -adrenérgica

Em fêmeas Wistar, os níveis de estradiol aumentam progressivamente a partir do 20º dia de vida, atingindo o pico entre os 35 e os 45 dias, o que corresponde à data do primeiro estro. Nos machos, os níveis de testosterona livre elevam-se a partir do 35º dia e atingem o seu valor máximo pelo 50º dia de vida (Zapatero-Caballero *et al.*, 2003; Zapatero-Caballero *et al.*, 2004). Degano *et al* demonstraram que doses elevadas de estradiol potenciam o efeito da acetilcolina

na sobre o MLT de fêmeas Wistar com 49 dias, enquanto que doses baixas têm o efeito oposto (Degano *et al.*, 2001; Degano *et al.*, 2003). No entanto, não se encontraram referências na literatura sobre diferenças de género na resposta do MLT ao brometo de metacolina em ratos Wistar em fases do desenvolvimento anteriores às quatro semanas. Quanto à resposta ao salbutamol, não se encontrou também informação sobre a comparação da resposta β_2 do MLVA entre o sexo masculino e o feminino em modelos animais. Começou-se, assim, por comparar as respostas a estes agentes farmacológicos entre machos e fêmeas dos dois grupos de controlo. Atendendo a que as fêmeas de 36 dias se encontravam em plena transição para a puberdade, manteve-se em aberto a hipótese de que a sensibilidade à metacolina fosse superior neste grupo relativamente aos machos da mesma idade.

Demonstrou-se que não existiam diferenças tanto nos valores basais da força isométrica como na resposta à estimulação colinérgica e β_2 -adrenérgica entre machos e fêmeas, tanto no grupo de controlo com 15 dias, quer no de 36, o que permitiu proceder à análise dos dados em grupos mistos.

1.1. Resposta à estimulação colinérgica

As $EC_{50\%}$ do brometo de metacolina de ambos os grupos de controlo (médias: $1.3 \times 10^{-3}M$ nos controlos de 15 dias e de $1.8 \times 10^{-3}M$ nos de 36 dias) foram superiores aos valores encontrados na literatura, tendo condicionado o reajuste da gama de concentrações inicialmente planeada de $10^{-8}M$ a $10^{-3}M$, para $10^{-7}M$ a $10^{-1}M$.

A heterogeneidade dos procedimentos experimentais entre os laboratórios, as diferentes metodologias de análise e de apresentação de resultados, bem como as reconhecidas diferenças na resposta ao mesmo estímulo não só entre espécies (Florio *et al.*, 1996; Preuss *et al.*, 1998; Preuss & Goldie, 1999), como entre estirpes da mesma

espécie (Florio *et al.*, 1996; Duguet *et al.*, 2000), dificultam a análise crítica destes dados.

Na Tabela 15 apresenta-se a síntese dos procedimentos de medição da tensão isométrica que mais se aproximam dos do presente trabalho e os valores correspondentes da $EC_{50\%}$ e F_{max} .

Os valores médios da $EC_{50\%}$ são, em todos os casos, inferiores aos que se obtiveram neste trabalho. A maior potência do carbacol relativamente à metacolina (Okamoto *et al.*, 2002) explica que o valor médio da $EC_{50\%}$, em particular de Denis e colaboradores, nos animais de 15 dias, tenha sido inferior à que se obteve no presente trabalho (van de Voorde & Joos, 1998; Denis *et al.*, 2001). Relativamente ao grupo que usou a metacolina (Clayton *et al.*, 1999), a diferença entre as dimensões da amostra de traqueia pode ter sido relevante, já que nos anéis com menores dimensões a difusão do agonista pela face epitelial da preparação está facilitada. Por outro lado, o facto de, no presente trabalho, se ter usado toda a traqueia dos animais de 15 dias e o segmento caudal com sete milímetros da dos mais velhos, exclui a possibilidade de a estimulação farmacológica ter sido feita em regiões menos sensíveis da traqueia onde, no rato, a resposta do MLT à estimulação colinérgica aumenta no sentido céfalo-caudal (Florio *et al.*, 1996).

A força máxima foi, em média, de 4.03 g no grupo de controlo com 15 dias e de 3.04 g nos mais velhos, valores que são superiores aos de todos os outros autores (Tabela 15). Estas diferenças podem ser atribuídas à dose cumulativa mais elevada e/ou reflectirem uma menor distorção mecânica dos cilindros de traqueia relativamente aos anéis e que, por isso, melhor se correlaciona com a massa de músculo presente (Florio *et al.*, 1996).

Outra razão das diferenças encontradas pode residir nos métodos de eutanásia. No presente trabalho optou-se pela eutanásia com dióxido de carbono, com o objectivo de minimizar repercussões de

anestésicos sobre o músculo liso e também por ser um dos métodos que menor sofrimento provoca nos animais. Em dois dos trabalhos foram usados anestésicos endovenosos, o fenobarbital (Clayton *et al.*, 1999) e o carbamato de etilo (Denis *et al.*, 2001), em relação aos quais não há referência sobre os efeitos na contractilidade do músculo liso *in vitro*. Sabe-se apenas que, na cobaia anestesiada com qualquer um destes agentes, há aumento da resistência basal do sistema respiratório e potenciação das respostas à acetilcolina, histamina e serotonina administradas em aerossol. No caso do fenobarbital e do carbamato de etilo, estes efeitos foram atribuídos à diminuição do tônus adrenérgico (Advenier *et al.*, 1978). Não se pode, assim, excluir que, a menor sensibilidade e reactividade à estimulação com metacolina encontradas no presente trabalho se devam, pelo menos em parte, ao método de eutanásia.

TABELA 15 – COMPARAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS DOS GRUPOS DE CONTROLO E OS DE OUTROS GRUPOS COM PROTOCOLOS SEMELHANTES.

	Estirpe	Agonista (M)	Idade	EC_{50%} (M)	F_{max} (g)	Traqueia (mm)
(Clayton <i>et al.</i> , 1999)	Wistar	Metacolina (10 ⁻⁹ – 10 ⁻⁴)	28-30 d	1.02*10 ⁻⁶	1.12	4
(van de Voorde & Joos, 1998)	Wistar	Carbacol (10 ⁻⁸ – 10 ⁻³)	Adultos	6.46* 10 ⁻⁷	2.26	2 – 3
(Denis <i>et al.</i> , 2001)	Wistar	Carbacol (10 ⁻⁸ – 10 ⁻³)	15d	1.50* 10 ⁻⁷	-	7
			Adultos	7.59* 10 ⁻⁸	2.51	4
(Gamboa <i>et al.</i> , 2005)	Wistar	Metacolina (10 ⁻⁷ – 10 ⁻¹)	15d	1.3*10 ⁻³	4.03	7
			36d	1.8*10 ⁻³	3.04	7

Finalmente, as diferenças encontradas na resposta à estimulação colinérgica relativamente às dos outros grupos, podem ser consequência de características intrínsecas dos animais usados neste

trabalho cuja reprodução foi feita no Biotério local, podendo diferir dos animais da mesma estirpe mas com proveniências diferentes usados noutros laboratórios.

Efeito da idade

Não se observaram diferenças na $EC_{50\%}$ de metacolina entre os controlos de 15 dias e os de 36. Estes resultados estão de acordo com os disponíveis na literatura relativamente a outros dois agonistas do mesmo grupo farmacológico, acetilcolina e carbacol, cuja sensibilidade à estimulação colinérgica em ratos Wistar não varia entre as quatro semanas de idade e os 34 meses (Preuss & Goldie, 1999).

No presente trabalho registou-se, no entanto, uma redução da força isométrica máxima nos animais mais velhos, que Preuss e Goldie não encontraram. Estes autores referem não terem encontrado diferenças estatisticamente significativas na força máxima a partir do primeiro mês de vida, apesar de terem observado uma redução progressiva dos níveis de fosfato de inositol intracelular durante este período (Preuss & Goldie, 1999). Contudo, encontraram-se noutras espécies animais dados consistentes com os do presente trabalho. No porco recém-nascido e lactente, o MLT tem maior sensibilidade ao Ca^{2+} , atingindo níveis de força máxima em resposta à estimulação colinérgica superiores aos do animal jovem e adulto (Sparrow & Mitchell, 1990). Demonstrou-se também que as diferenças na resposta *in vitro* à estimulação com metacolina são independentes da distribuição dos receptores muscarínicos, da massa de músculo e do seu conteúdo em miosina, bem como dos elementos não musculares da preparação (Murphy *et al.*, 1991a), estando ainda por esclarecer o mecanismo responsável por estas variações no período neonatal.

O comportamento observado nos grupos de controlo de 15 e de 36 dias foi semelhante ao do músculo liso de brônquio humano, no qual, com a idade, há uma redução da força isométrica máxima

em resposta à estimulação *in vitro* com carbacol (Fayon *et al.*, 1994).

1.2. Resposta à estimulação β_2 -adrenérgica

No rato, o tónus basal do MLT não é significativo (Fayon *et al.*, 2002), pelo que o relaxamento foi medido em subgrupos dos animais em que previamente se induziu contracção com metacolina. Tal como se observou com a EC_{50%} de metacolina, as médias das EC_{50%} de salbutamol nos dois grupos de controlo foram superiores às encontradas noutros trabalhos em animais desta espécie e mesmo desta estirpe (Preuss *et al.*, 1999). A razão desta diferença pode ter sido a indução de antagonismo funcional ao salbutamol pela elevada concentração cumulativa de metacolina administrada previamente. Entende-se por “antagonismo funcional” a relação inversa entre o grau de estimulação colinérgica e a capacidade de um agonista dos receptores β_2 induzir relaxamento (Frossard & Landry, 1985; Ehlert, 2003a) e que resulta da interacção com os receptores M₂ do músculo liso (Ehlert, 2003a; Walker *et al.*, 2004; Proskocil & Fryer, 2005). Este efeito foi observado *in vivo* em indivíduos saudáveis e em doentes com asma assintomática (Elsasser *et al.*, 1996) e também no MLVA de alguns animais como o rato (Frossard & Landry, 1985) e o cão (Fernandes *et al.*, 1992), quando a resposta foi medida *in vitro* e em condições isométricas (Roux *et al.*, 1998).

Efeito da idade

No presente trabalho verificou-se uma redução significativa da sensibilidade ao salbutamol nos animais com 36 dias relativamente aos de 15 dias de idade. Nos mais velhos, não foi possível determinar a EC_{50%} de salbutamol, uma vez que as relações dose-resposta pouco se afastaram da horizontal, tendo-se atingido uma redução de

apenas $8.1\% \pm 2.10\%$ da força isométrica máxima, após a administração da última dose cumulativa de salbutamol.

Estes resultados diferem dos de outros autores que observaram ou uma ausência de variação no relaxamento máximo induzido pelo isoproterenol entre as 4 e as 11 semanas (Frossard & Landry, 1985), ou um aumento da potência *in vitro* deste agonista em fases precoces do desenvolvimento, não relacionado com alterações na densidade ou afinidade dos receptores β_2 (Preuss *et al.*, 1999). Assim, uma vez que a variação em número ou afinidade dos receptores β_2 -adrenérgicos não parece ter expressão funcional em ratos Wistar, é provável que os resultados observados não estejam relacionados directamente com eles, mas antes com a expressão e resposta dos receptores muscarínicos M_2 e M_3 que variam com a maturação (Roux *et al.*, 1998; Fayon *et al.*, 2004). Demonstrou-se recentemente que a maior potência dos agonistas β_2 -adrenérgicos em traqueias isoladas de ratos Wistar imaturos relativamente aos adultos, se relacionava com uma menor expressão de receptores M_2 do músculo liso nos mais jovens, quando a contracção prévia é induzida pelo carbachol (Fayon *et al.*, 2004).

A administração de um agonista colinérgico provoca a estimulação dos receptores M_2 e M_3 do músculo liso, sendo a transdução do sinal mediada pela via das proteínas G. A estimulação do receptor M_3 leva, através da proteína G_{qq} , à activação da quinase das cadeias leves de miosina (MLCK), processo que conduz à contracção do músculo liso. Por seu lado, a estimulação dos receptores M_2 pós-juncionais, que actua através da proteína G_i , inibe a actividade da adenilciclase, antagonizando funcionalmente o efeito da estimulação dos receptores β_2 -adrenérgicos que (Figura 23), via proteína G_s , activam a adenilciclase, com o aumento consequente da proteína quinase C, que conduz ao relaxamento muscular (Ehlert, 2003b; Racke & Matthiesen, 2004; Proskocil & Fryer, 2005).

Os ratos jovens não apresentam também diferenças significativas na resposta à estimulação β_2 -adrenérgica quando os receptores M_2 são bloqueados selectivamente pela metoctramina, ao contrário dos ratos adultos, o que corresponde à demonstração experimental de que o relaxamento do MLVA pode ser inibido pela estimulação prévia com um agonista colinérgico (Fayon *et al.*, 2004).

Assim, os resultados encontrados no presente trabalho poderão ser devidos ao antagonismo funcional ao salbutamol induzido pela administração de concentrações elevadas de metacolina. Nos animais de 15 dias, a resposta poderá não ter sido abolida precisamente devido à menor densidade de receptores M_2 (Fayon *et al.*, 2004), enquanto que nos mais velhos a expressão de um maior número destes receptores poderá ter sido suficiente para antagonizar funcionalmente a resposta à estimulação β_2 -adrenérgica (Figura 23).

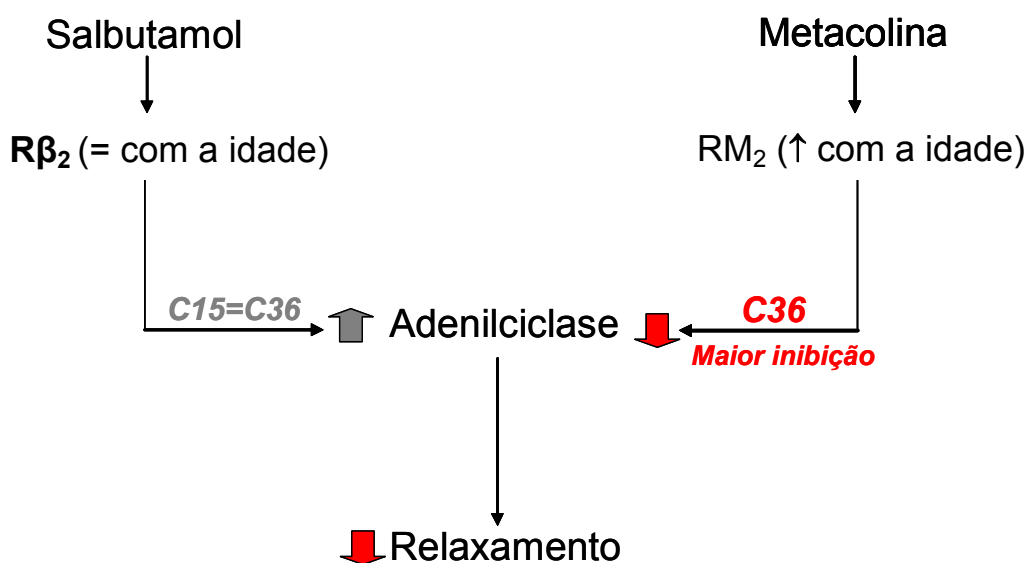


Figura 23 – Resposta dos grupos de controlo à estimulação β_2 -adrenérgica. Repercussões do antagonismo funcional induzido por concentrações elevadas de metacolina. A menor densidade de receptores M_2 (RM_2) no MLT do grupo Controlo 15d (C15) relativamente ao grupo Controlo 36d (C36) pode ter sido responsável pela menor inibição do efeito do salbutamol, uma vez que a sensibilidade dos receptores β_2 ($R\beta_2$) não varia com a idade.

2. Avaliação Morfológica

Apesar de apenas ter sido possível determinar a área de músculo liso um número reduzido de amostras, este trabalho beneficiou da larga experiência daquele laboratório na avaliação quantitativa do MLVA (Florio *et al.*, 1996; Demnati *et al.*, 1998; Martin *et al.*, 2000; Martin & Ramos-Barbon, 2005). Os resultados do presente trabalho foram consistentes com os de outros grupos que verificaram que a proporção entre a massa de músculo e as dimensões das vias aéreas se mantém relativamente constante durante o desenvolvimento. Nos dois estudos que avaliaram a área de músculo em ratos tão jovens como os usados no presente trabalho (Denis *et al.*, 2001; Fayon *et al.*, 2002) verificou-se, com efeito, que aquela relação não se altera significativamente, à semelhança do que acontece no humano (Sward-Comunelli *et al.*, 1997; Burri & Hislop, 1998). No entanto, no presente trabalho, observou-se uma maior variabilidade dos valores individuais no grupo Controlo 36d que no grupo mais novo, o que pode traduzir as diferenças no crescimento somático que se acentuaram com a idade.

Os restantes aspectos morfológicos da arquitectura da traqueia foram avaliados qualitativamente em microscopia óptica, uma vez que, à data da realização da parte experimental do presente trabalho, não havia disponibilidade de recursos para efectuar outras medições quantitativas.

Prestou-se atenção particular à integridade da preparação que, a não se verificar, poderia modificar a resposta funcional à estimulação farmacológica *in vitro*. O controlo histológico feito por microscopia óptica não revelou soluções de continuidade na mucosa ou na muscular da traqueia em nenhuma preparação. A confirmação destes quesitos metodológicos permitiu garantir que os resultados da avaliação funcional *in vitro* não foram influenciados pela manipulação das preparações.

II. REPERCUSSÕES CRÓNICAS DA EXPOSIÇÃO A 50%O₂

1. Sobrevivência e repercussões sobre o crescimento somático

A sobrevivência à exposição a 50%O₂ e ao período de recuperação em ar ambiente foi de 100%, tanto para as ninhadas como para as progenitoras, resultados que são compatíveis com os de outros laboratórios (Denis *et al.*, 2001; Fayon *et al.*, 2002; Belik *et al.*, 2004). Este aspecto foi determinante para o desenho experimental do presente trabalho, onde a utilização de ratos recém-nascidos, naturalmente tolerantes a níveis de hiperóxia elevados, pressupunha a colocação de fêmeas adultas na câmara de hiperóxia durante as primeiras duas semanas. A estratégia seguida por outros grupos tem sido a de alternar diariamente pelo menos duas fêmeas adultas entre a câmara de hiperóxia e o ar ambiente, uma vez que os adultos têm menor tolerância a níveis elevados de oxigénio (Denis *et al.*, 2001; Fayon *et al.*, 2002). Estes dados e o facto de as progenitoras não terem apresentado variações do peso relativamente à média das fêmeas da mesma idade em condições de normóxia, permitem concluir que a manutenção do mesmo animal adulto durante quinze dias em hiperóxia não contribuiu desfavoravelmente para o desenvolvimento da ninhada. Consistente com esta conclusão é o facto de o peso dos animais dos grupos experimentais ter sido inferior em apenas 7.6% ao dos grupos de controlo, enquanto que a observada por outros em animais da mesma idade sujeitos a condições de hiperóxia idênticas foi de 15% a 20% (Denis *et al.*, 2001; Fayon *et al.*, 2002).

2. Comparação entre machos e fêmeas – respostas à estimulação colinérgica e β_2 -adrenérgica

Não se observaram diferenças significativas na resposta do MLT à estimulação colinérgica e β_2 -adrenérgica entre machos e fêmeas dos dois grupos experimentais, demonstrando que a suscepti-

bilidade do MLT à hiperóxia não é dependente do sexo nesta fase do desenvolvimento. Procedeu-se, assim, à análise dos resultados em grupos mistos.

3. Resposta à estimulação β_2 -adrenérgica

A resposta ao salbutamol sofreu repercussões da exposição à hiperóxia durante 15 dias, tendo-se observado uma redução significativa da $EC_{50\%}$ e aumento do relaxamento do músculo relativamente ao grupo de controlo respectivo.

Estes resultados estão de acordo com os observados por outros autores que usaram um protocolo semelhante e avaliaram os animais ao fim do mesmo período de exposição neonatal a 50% de oxigénio (Fayon *et al.*, 2002). No entanto, os mecanismos responsáveis por um maior relaxamento induzido pela estimulação β_2 -adrenérgica não foram ainda esclarecidos. Num outro trabalho, em que foi usada a estimulação eléctrica *in vitro* em MLT de animais que permaneceram apenas uma semana em níveis superiores a 95%O₂, observou-se uma redução do relaxamento após a exposição a hiperóxia. Este efeito foi relacionado com a diminuição da libertação de prostaglandina E₂ (PGE₂) e dos níveis de AMPc intracelular (Mhanna *et al.*, 2004). As diferenças existentes entre os níveis de hiperóxia, tempos de exposição e métodos de estimulação entre a maioria dos diferentes protocolos disponíveis na literatura de referência, não permitem estabelecer comparações com os resultados deste trabalho. Em particular, quando o relaxamento é induzido por métodos não farmacológicos como a estimulação eléctrica, a resposta é em parte mediada pela libertação de óxido nítrico e de prostaglandinas endógenas (Belvisi *et al.*, 1995; Szarek *et al.*, 1995) que podem estar reduzidas após a exposição a 95%O₂ (Iben *et al.*, 2000) o que pode explicar os resultados de Mhanna *et al.*

No presente trabalho, é provável que a administração prévia de metacolina possa ter induzido antagonismo funcional entre receptores M_2 e β_2 , como já foi referido anteriormente. Se assim tiver sido, a resposta aumentada ao salbutamol poderá significar que o efeito da estimulação colinérgica sobre os receptores M_2 pós-juncionais, ou mecanismos intracelulares a jusante, se atenuaram com exposição à hiperóxia, facilitando a acção da estimulação β_2 -adrenérgica (Figura 24).

Existe, na génese da hiperreactividade brônquica, um componente relacionado com a alteração da função dos receptores neuronais M_2 pós-ganglionares. Em condições normais, a libertação de acetilcolina das terminações nervosas provoca, por um lado, a contracção do músculo liso através dos receptores M_3 e, por outro, activa os receptores pré-juncionais M_2 , inibindo a libertação de mais acetilcolina. A diminuição da afinidade destes receptores ou da sua síntese *de novo* são mecanismos apontados como responsáveis na génese da hiperreactividade brônquica (Minette *et al.*, 1989; Racke & Matthiesen, 2004).

Diferentes estudos demonstraram haver uma alteração pré-juncional dos receptores M_2 (Costello *et al.*, 1997; Fryer & Jacoby, 1998; Costello *et al.*, 1998; Costello *et al.*, 2000; Coulson & Fryer, 2003) em modelos animais de HRB induzida por alergénios, vírus (Jacoby *et al.*, 1998; Adamko *et al.*, 1999; Adamko *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2004), pelo ozono (Schultheis *et al.*, 1994), pela deficiência em vitamina A (McGowan *et al.*, 2002) e pela exposição a insecticidas com organofosforados (Fryer *et al.*, 2004; Lein & Fryer, 2005). No presente trabalho, em que a estimulação foi farmacológica, ter-se-á dado a activação dos receptores M_2 pós-juncionais, cujas funções nas vias aéreas não têm sido tão amplamente investigadas.

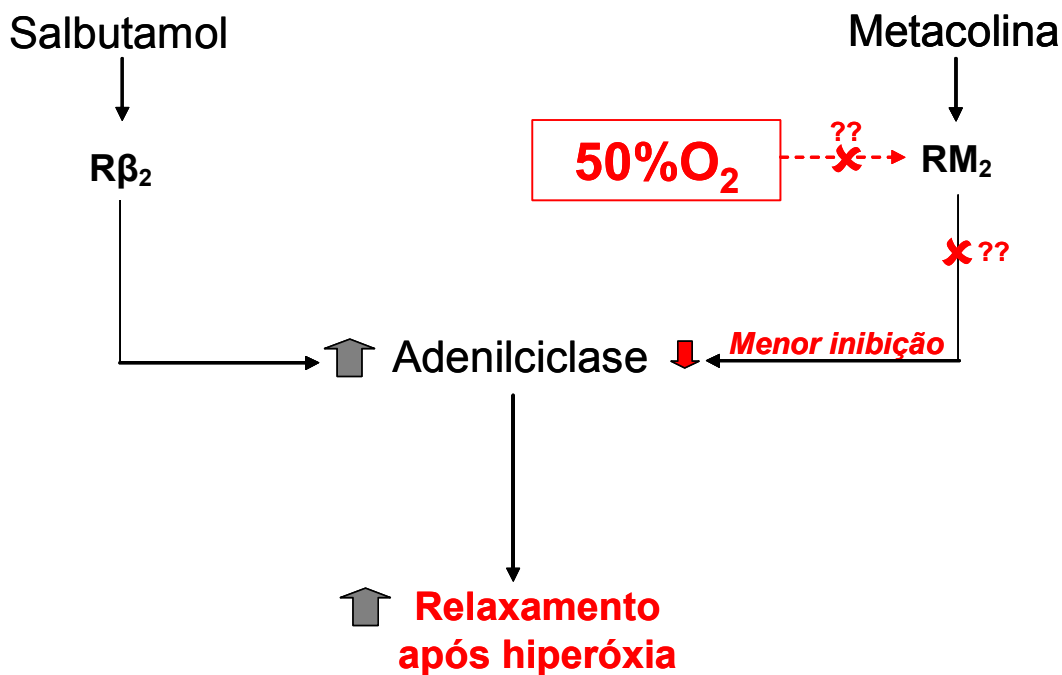


Figura 24 – Repercussões imediatas da hiperóxia sobre a resposta à estimulação β₂-adrenérgica – o aumento do relaxamento induzido pelo salbutamol observado imediatamente após a exposição à hiperóxia pode dever-se à alteração dos receptores M₂ (RM₂) ou dos mecanismos intracelulares a jusante, resultando numa menor inibição da adenilciclase e, por esta via, do efeito da estimulação dos receptores β₂ (Rβ₂) pelo salbutamol. Após o período de recuperação em ar ambiente a resposta ao salbutamol aproximou-se da do grupo de controlo, o que é sugestivo de reversibilidade da alteração induzida pela hiperóxia.

Após o período de recuperação em ar ambiente, no grupo 50%O₂ + Ar, o relaxamento induzido pelo salbutamol foi superior em 20% ao observado no grupo de controlo com 36 dias. Embora a resposta à estimulação β₂-adrenérgica possa estar condicionada pelo antagonismo funcional induzido pela administração prévia de metacolina, os resultados são sugestivos de que o efeito descrito sobre os receptores M₂, ou a jusante, seja parcialmente reversível após o retorno a condições de normóxia.

4. Resposta à estimulação colinérgica e correlações morfo-funcionais

Relativamente às repercussões sobre a estimulação colinérgica, não se observaram diferenças significativas entre as médias da $EC_{50\%}$ e da F_{max} do grupo 50%O₂ e do grupo de controlo da mesma idade, sendo as curvas de dose-resposta de ambos praticamente sobreponíveis.

Estes resultados diferem dos de outros autores que obtiveram um aumento da resposta à estimulação colinérgica no rato hiperóxico *in vitro* (Hershenson *et al.*, 1994c; Szarek *et al.*, 1995; Denis *et al.*, 2001) e *in vivo* (Hershenson *et al.*, 1992a; Hershenson *et al.*, 1992b; Solway & Hershenson, 1995; Burghardt *et al.*, 1996).

Nos estudos *in vitro*, a exposição contínua de ratos Sprague-Dawley a níveis superiores a 80%O₂ durante uma semana, induziu um aumento da força isométrica máxima de anéis de traqueia, em resposta à estimulação colinérgica, induzida tanto por estimulação eléctrica como farmacológica (Szarek, 1989; Hershenson *et al.*, 1994c). A comparação destes resultados com os do presente trabalho é, no entanto, difícil uma vez que os protocolos diferem em aspectos essenciais, como sejam a fase do desenvolvimento em que se iniciou a exposição e a duração desta, o nível de hiperóxia e os métodos de estimulação colinérgica *in vitro*, desconhecendo-se também se existem diferenças na susceptibilidade à hiperóxia entre as estirpes Wistar e Sprague-Dawley.

Denis e colaboradores, usando um protocolo de exposição neonatal a 50%O₂ e a mesma metodologia que o presente trabalho verificaram também que a $EC_{50\%}$ de carbacol não variava ao fim dos 15 dias de hiperóxia num grupo de oito ratos Wistar. Observaram, no entanto, um aumento da força isométrica máxima que não se verificou no presente trabalho (Denis *et al.*, 2001). As diferenças existentes relativamente ao presente protocolo foram o agonista coliné-

gico aplicado na estimulação *in vitro* – em que aqueles autores usaram o carbacol que é mais potente que a metacolina – e o método de eutanásia. Tal como foi dito em relação aos grupos de controlo, a diferença entre os métodos de eutanásia pode ter contribuído para os resultados do presente trabalho. Para assegurar a menor interferência possível com a resposta do músculo liso optou-se pela narco-se com dióxido de carbono, enquanto que Denis e colaboradores usaram o carbamato de etilo, que se demonstrou potenciar a resposta do músculo liso à acetilcolina (Advenier *et al.*, 1978; Denis *et al.*, 2001).

Outro factor metodológico que pode ter contribuído para as diferenças entre os presentes resultados e os de Denis e colaboradores, diz respeito à manutenção da integridade do epitélio traqueal, uma vez que a ausência de epitélio se relaciona com a diminuição da sensibilidade à acetilcolina induzida pela hiperóxia em níveis superiores a 90%O₂, embora não modifique a força máxima (Hershenson *et al.*, 1994c). Não houve, em nenhum dos casos observados no presente trabalho, ruptura ou soluções de continuidade desta estrutura, mesmo após o final de todo o procedimento de medição da força isométrica. Considera-se, assim, pouco provável que tenha sido a remoção accidental do epitélio em todas as restantes amostras a causa da ausência de diferenças entre o grupo 50%O₂ e o grupo Controlo 15 dias.

Assim, de entre os factores metodológicos potencialmente responsáveis pelas diferenças encontradas relativamente a Denis e colaboradores, parece ser mais provável que o diferente método de eutanásia tenha favorecido o aumento da resposta contráctil encontrado por aqueles autores após a hiperóxia.

Contudo, as alterações da arquitectura da traqueia, encontradas no grupo 50%O₂ fundamentam uma outra hipótese plausível para a diferença entre os resultados do presente trabalho e os de Denis

e colaboradores. Enquanto aquele grupo encontrou um abundante infiltrado inflamatório limitado à submucosa e adventícia, no grupo 50%O₂ encontrou-se, nessas mesmas regiões, um aumento da espessura da matriz extracelular (MEC), mas sem evidência de alterações qualitativas da densidade das células inflamatórias. Estas diferenças podem dever-se a diferenças no padrão da resposta à hiperóxia entre as linhagens de ratos Wistar. As opiniões de diferentes autores são concordantes quanto ao papel da agressão directa das ROS sobre o epitélio, os miofibroblastos e fibroblastos e também do músculo liso, nas fases iniciais da exposição à hiperóxia (Fracica *et al.*, 1991; Crapo *et al.*, 1994; Warner *et al.*, 1998; Kinnula, 2005). Em condições normobáricas, a hiperóxia induz o aumento da produção de anião superóxido, peróxido de hidrogénio, radical hidróxilo e de singuleto de oxigénio (Freeman & Crapo, 1981; Freeman & Tanswell, 1985). Quanto à relação entre a hiperóxia moderada e a produção de ROS, sabe-se que a produção de peróxido de hidrogénio aumenta linearmente entre 0% e 60% de oxigénio, dando origem ao ião hidróxilo. Por si só, o ião hidróxilo é capaz de induzir modificações da estrutura proteica, que resultam na desnaturação das cadeias polipeptídicas e na alteração da estrutura do DNA, bem como à oxidação dos lípidos da membrana celular e dos organelos intracelulares. Estas alterações são suficientes para provocar o aumento da permeabilidade capilar e o recrutamento de células inflamatórias para o pulmão, o que é ainda potenciado pela acção das ROS como segundos mensageiros intracelulares. As ROS, em particular o peróxido de hidrogénio, induzem a activação de genes pró-inflamatórios e, por esta via, aumentam a síntese citocinas e quimiocinas, (Barnes & Karin, 1997; D'Angio & Finkelstein, 2000; Sadikot *et al.*, 2004; D'Angio *et al.*, 2004), como o TNF α e o IL-1 β (Johnston *et al.*, 1998) pelas células estruturais da traqueia (Chung, 2000; Sukkar *et al.*, 2004; Howarth *et al.*, 2004).

De acordo com o padrão das alterações histológicas do pulmão induzidas pela hiperóxia, tal como foi descrita por Crapo, a exposição a níveis sub-letais de oxigénio atrasa o início da fase inflamatória e diminui a sua gravidade e duração. Nestas condições, os neutrófilos aumentam progressivamente no pulmão após cinco dias de hiperóxia, voltando a valores negligenciáveis ao fim de uma semana (Crapo, 1986). Assim, os resultados da avaliação qualitativa das alterações histológicas da traqueia dos animais do grupo 50%O₂, que não revelaram um aumento expressivo daquelas células, foram concordantes com a evolução da resposta à hiperóxia observada no parênquima pulmonar (Laudert *et al.*, 1994; Capellier *et al.*, 1999). É provável que, ao longo dos 15 dias de exposição à hiperóxia, o *stress* oxidativo se tenha atenuado progressivamente através do aumento da produção de enzimas antioxidantes. Uma das consequências do desenvolvimento de tolerância pode ter sido a diminuição da libertação de factores quimiotáticos para os neutrófilos pelas células estruturais da traqueia, enquanto que os que migraram da circulação nas fases iniciais da lesão poderão ter sofrido apoptose ao longo da primeira semana. Não se observaram também alterações das células epiteliais relativamente ao grupo de controlo, apresentando-se o epitélio com idêntica espessura e sem destruição dos cílios, aspectos que se assemelham aos resultados de Denis e colaboradores.

Os animais do grupo 50%O₂ foram mantidos em hiperóxia moderada durante os primeiros 15 dias de vida, fase em que o ML das vias aéreas continua, em condições normais, a multiplicar-se proporcionalmente ao alongamento e ao aumento de diâmetro das vias aéreas (Burri, 1984). No parênquima pulmonar, a exposição à hiperóxia moderada induz a libertação de factores de crescimento (Han *et al.*, 1996). Também a actividade mitogénica do lavado bronco-alveolar sobre o MLT está aumentada após a exposição aguda de ra-

tos jovens a 95%O₂ (Hershenson *et al.*, 1994b) e a correlação encontrada entre a hiperplasia do MLT e o aumento da síntese de leucotrienos após a exposição crónica a 65%O₂ (Burghardt *et al.*, 1996) demonstram que o *stress* oxidativo induzido pela hiperóxia tem a capacidade de induzir alterações proliferativas do ML (Pandya *et al.*, 2002), por vias ainda não conhecidas, mas não exclusivamente dependentes da activação da via quinases activadas por mitogénios (MAPK).

No presente trabalho encontrou-se um aumento de 25.6% da área de músculo do grupo 50%O₂ relativamente aos controlos da mesma idade. Como foi dito a propósito da caracterização dos grupos de controlo, o número de amostras medidas foi insuficiente para avaliar o significado estatístico destas diferenças. Assim, apenas é possível especular sobre a aparente dissociação entre a tendência para o aumento da área de músculo e a ausência de variação da resposta à estimulação colinérgica.

As alterações histológicas observadas ao fim de 15 dias de hiperóxia são não só o resultado da amplificação da resposta inflamatória por células migradas para o pulmão, como das actividades sintética e proliferativa (Howarth *et al.*, 2004) dos miofibroblastos e pelos miócitos da traqueia que, perante um o aumento da produção de ROS, podem retomar um fenótipo semelhante ao encontrado em fases precoces do desenvolvimento. Na fase em que a avaliação dos efeitos imediatos da hiperóxia foi feita, é provável que o aumento da espessura da MEC seja o resultado da actividade secretora daquelas células. Observou-se também o aumento da espessura da MEC na vizinhança imediata dos miócitos, que Denis e colaboradores não encontraram nas suas preparações (Denis *et al.*, 2001), o que é um argumento a favor de o padrão da resposta naquele grupo não ter sido igual ao dos animais usados no presente trabalho.

A deposição da MEC na vizinhança imediata do músculo é sugestiva de que, ao fim de 15 dias de exposição contínua à hiperóxia, os miócitos e os miofibroblastos tenham contribuído para a síntese de proteínas da MEC. À semelhança do que outros autores encontraram em ratos Sprague-Dawley expostos a 95%O₂, estas alterações podem ter sido o resultado do desequilíbrio entre o factor inibidor das metaloproteinases (TIMP) e as metaloproteinases da matriz (MMP) que a degradam, favorecendo o primeiro (Pardo *et al.*, 1998; Martin *et al.*, 2005). Em homogeneizados de pulmão de ratos Sprague-Dawley com idades compreendidas entre os 4 e os 14 dias, verificou-se que a exposição à hiperóxia induz a diminuição da expressão dos níveis de MMP-2 e MMP-9, acompanhada de aumento de TIMP (Hosford *et al.*, 2004). No parênquima pulmonar de ratos Wistar prematuros, obtidos por cesariana 24 horas antes do termo da gestação e expostos continuamente a 100%O₂ por duas semanas, observou-se a diminuição da expressão dos genes responsáveis pela síntese de MMP-2 e MMP-9 e o aumento da expressão do gene para a TIMP (Wagenaar *et al.*, 2004).

É possível que a ausência de alterações significativas da F_{max%} e da EC_{50%} de metacolina seja consequência de o MLT se encontrar predominantemente em fase secretora, ao fim dos 15 dias de hiperóxia.

Nas preparações coradas pelo método de Mann-Dominici, encontrou-se um aumento de mastócitos, à semelhança do que Denis e colaboradores observaram por imunocitoquímica (Denis *et al.*, 2001) e, recentemente, de Brock e colaboradores em preparações coradas com azul de toluidina (Brock & Di, 2006). Tal como aqueles autores, observaram-se alterações significativas dos mastócitos da submucosa e da adventícia que, nos casos avaliados no presente trabalho, se localizavam preferencialmente na vizinhança do músculo.

A presença de mastócitos desgranulados constituiu uma das observações mais interessantes do modelo e foi um achado accidental durante a pesquisa de células inflamatórias em preparações inicialmente coradas apenas com hematoxilina-eosina, em que o objectivo era avaliar a presença de neutrófilos. Para desgranularem, os mastócitos têm de ser activados, sendo o principal activador até agora identificado, o *stem cell factor* (SCF) que pode ser produzido pelas células epiteliais, pelos miofibroblastos e miócitos das vias aéreas (Thangam *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2006). A presença destas células ao fim de duas semanas, numa fase em que já não eram visíveis neutrófilos, é compatível com a activação dos mastócitos pelas células estruturais e/ou residentes na traqueia (Figura 25). Em resposta à activação pelo SCF, os mastócitos secretam histamina, prostaglandina D₂ (PGD₂) e leucotrieno C₄ (LTC₄), que são capazes de induzir broncoconstrição, secreção de muco e edema da mucosa, manifestações características da asma. No entanto, os mastócitos segregam também citocinas pró-inflamatórias, como a IL-4, IL-5 e IL-13 que regulam a síntese de IgE, o desenvolvimento da inflamação eosinofílica e de citocinas pró-fibrogénicas incluindo o factor de transformação e crescimento (TGF) β e o factor básico do crescimento dos fibroblastos (FGF-2). Os principais produtos de secreção dos mastócitos são as serina-proteases triptase, quimase e carboxipeptidase que interagem com as células vizinhas através de receptores activados por proteases (PAR) (Kraneveld *et al.*, 2002; Boyce, 2003; Gurish & Boyce, 2006; Okayama *et al.*, 2006; Sim *et al.*, 2006). As serina-proteases, têm efeitos mitogénicos variáveis sobre o MLVA. A triptase mastocitária, em particular, tem efeitos mitogénicos potentes sobre o MLVA em modelos animais (Brown *et al.*, 1995) humano em cultura de células (Brown *et al.*, 2001; Brown *et al.*, 2002) e estimula a proliferação de fibroblastos e a produção de colagénio tipo I (Akers *et al.*, 2000). Através da libertação de IL1 β e de concentra-

ções elevadas de $\text{TNF}\alpha$ pode induzir a síntese de IL-6, IL-8, eotaxina e moléculas de adesão pelo MLT (Page *et al.*, 2001), contribuindo para a predominância do fenótipo secretor e para a ausência de alterações funcionais do ML em resposta à estimulação colinérgica (Figura 25).

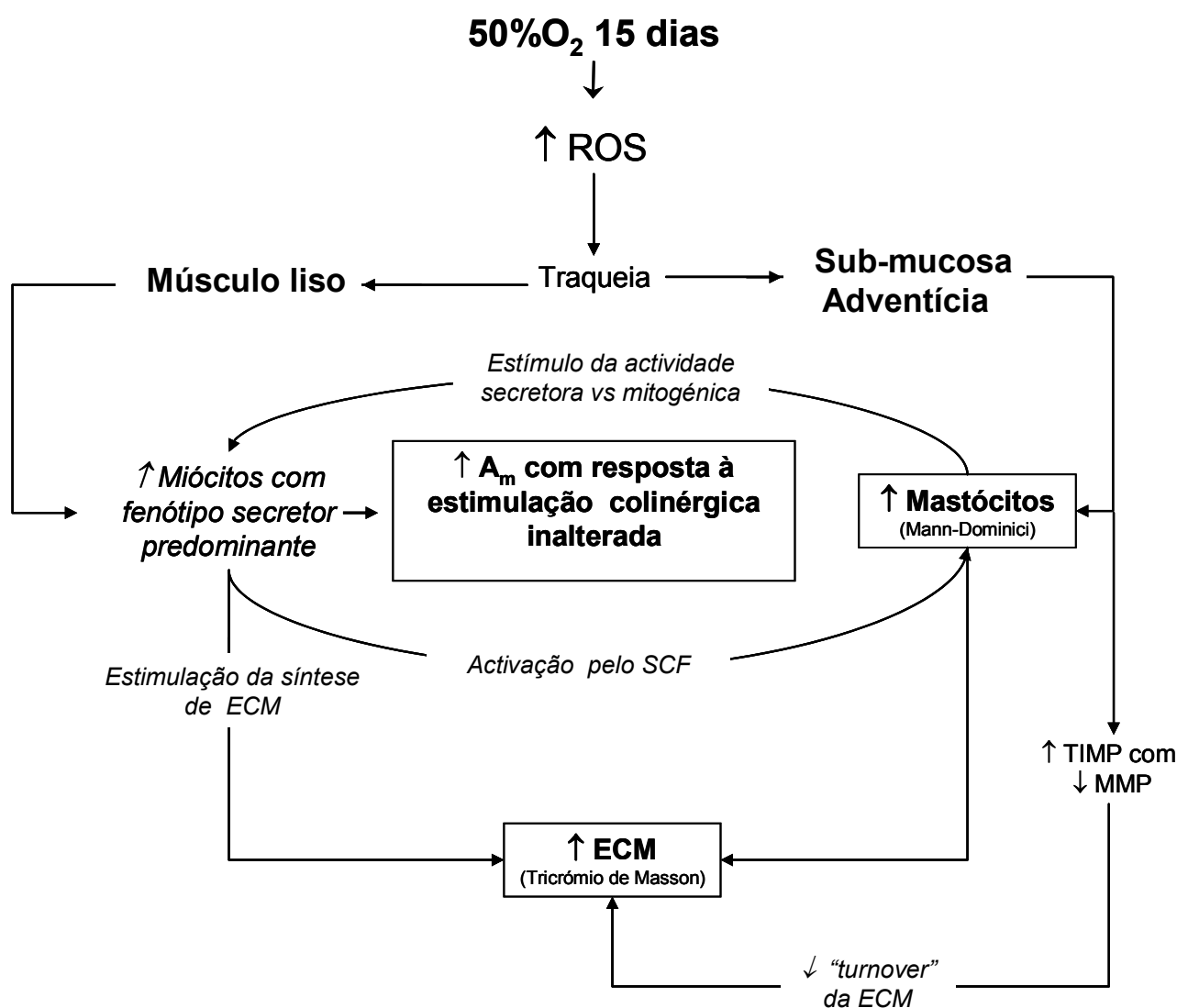


Figura 25 – Efeitos imediatos da exposição a 50%O₂ durante 15 dias. A exposição à hiperóxia induz um aumento da produção de ROS de que pode ter resultado a síntese de quimiocinas, citocinas e de factores de crescimento pelas células estruturais da traqueia. O recrutamento dos mastócitos pode ser induzido, quer directamente pelos ROS, quer pela libertação de SCF (stem cell factor) pelo músculo liso, o que potenciará a actividade secretora dos miócitos. O aumento da síntese de proteínas da matriz extracelular (MEC) associado ao aumento do inibidor (TIMP) das metaloproteinasas (MMP) podem ser a explicação do aumento da espessura ECM. A convergência destes mecanismos pode explicar a ausência de alterações da contractilidade do MLT em resposta à estimulação colinérgica, apesar do aumento da área de músculo (A_m).

As alterações morfológicas do presente modelo foram semelhantes às encontradas não só nas vias aéreas de primatas (babuínos) sujeitos a níveis elevados de hiperóxia, com aumento de mastócitos no parênquima pulmonar, como em autópsias de recém-nascidos com DBP (Lyle *et al.*, 1995; Chang & Crapo, 2002; Chang *et al.*, 2003). É possível que os mastócitos possam ter um papel importante na patogénese das alterações da HRB e do parênquima encontradas na DBP, hipótese que só recentemente foi colocada por Sunday e colaboradores, relativamente ao parênquima pulmonar (Sunday *et al.*, 2004).

Após o período de recuperação em ar ambiente, houve um desvio da curva dose-resposta para a esquerda no grupo 50%O₂+Ar em relação ao grupo de controlo com 36 dias de idade. A EC_{50%} apresentou uma redução significativa ($p < 0.001$) de 1.8×10^{-3} M no grupo Controlo 36 d para 5.7×10^{-5} M após a recuperação. Também a variação da F_{max} relativamente ao valor basal aumentou de $700\% \pm 192.7\%$ para $1014\% \pm 225.4\%$. Demonstrou-se, assim, pela primeira vez que a hiperóxia neonatal moderada, apesar de poder não ter expressão funcional imediatamente após a exposição, pode provocar o aumento da contractilidade do MLT à estimulação colinérgica após os estímulo ter cessado. Este modelo representa, pois, um contributo para a avaliação dos mecanismos responsáveis pela HRB persistente ao longo da infância e adolescência de crianças nascidas prematuras e sujeitas a oxigenioterapia neonatal prolongada (Halvorsen *et al.*, 2004; Halvorsen *et al.*, 2005). O aumento da área de MLT relativamente ao grupo Controlo 36d foi da mesma ordem de grandeza do que se encontrou imediatamente após os 15 dias de exposição a 50% O₂. No entanto, porque as alterações da MEC foram reversíveis (Figura 26), é pouco provável que a medição da área de músculo

neste grupo tenha sido alterada pelo aumento do interstício, contrário do grupo 50%O₂.

Os resultados histológicos fornecem argumentos que permitem estabelecer uma hipotética relação morfofuncional: tal como se observou no grupo 50%O₂, encontrou-se um maior número de mastócitos com imagens de desgranulação no grupo 50%O₂ + Ar que no grupo de controlo da mesma idade (Figura 26). Estes factos são compatíveis com a estimulação crónica e persistente dos mastócitos, que tanto pode ter resultado da exposição à hiperóxia, como da passagem para o ar atmosférico ou da sequência de ambos.

A pertinência da presença de mastócitos em estreita contiguidade com o MLT, coexistindo com um aumento da sensibilidade do músculo à estimulação colinérgica, é bem ilustrada pelos dados existentes relativamente ao seu papel na patogénese da HRB na asma. Apesar de se aceitar que as alterações funcionais e da arquitectura das vias aéreas características da asma são consequência de um processo inflamatório, esta relação parece ser relativamente fraca: um exemplo da dissociação entre a inflamação das vias aéreas e a hiperreactividade brônquica no humano é particularmente evidente quando se compara a asma com a bronquite crónica eosinofílica (BCE) (Brightling & Bradding, 2005). A BCE é responsável por 15% dos casos de tosse crónica em pneumologia, e caracteriza-se pela sensibilidade à terapêutica com corticóides e pela presença de eosinofilia na expectoração, com ausência de obstrução variável das vias aéreas ou de hiperreactividade brônquica (Brightling *et al.*, 1999). Contudo, sob o ponto de vista imunopatológico a asma e a BCE são praticamente idênticas no que diz respeito às características do lavado bronco-alveolar, ao infiltrado de eosinófilos e número de mastócitos na mucosa, à expressão de IL-4 e IL-5, à integridade do epitélio, à deposição de colagénio abaixo da membrana basal e às concentrações de histamina e PGD₂ (Brightling *et al.*, 2003).

Assim, o corolário destas observações parece ser que muitas das alterações previamente consideradas características da asma podem não ser fundamentais na fisiopatologia da obstrução das vias aéreas e da hiperreactividade brônquica (Bradding *et al.*, 2006). As únicas diferenças encontradas entre a asma e a BCE são os níveis elevados de IL-13 na expectoração induzida dos asmáticos e, mais importante, as diferenças na localização dos mastócitos relativamente ao músculo liso. Na asma, observam-se mastócitos entre as fibras do ML, enquanto nos doentes com BCE, tal como nos saudáveis, se localizam predominantemente na mucosa (Brightling *et al.*, 2002; El-Shazly *et al.*, 2006). Os dados de Brightling reforçaram a hipótese de que a infiltração do músculo liso por mastócitos pode ser determinante para o fenótipo da asma, explicando ainda a correlação entre o número de mastócitos e a hiperreactividade brônquica encontrada em asmáticos (Page *et al.*, 2001).

É plausível que, no presente modelo experimental, o evidente desvio para a esquerda da curva de dose-resposta após a recuperação da hiperóxia esteja também relacionado com a localização dos mastócitos. Esta hipótese é compatível com um aumento da área de músculo que pode ter tido início com a exposição à hiperóxia, mas atingir expressão funcional durante a fase de recuperação, evoluindo para um fenótipo contráctil, uma vez que a exposição a concentrações excessivas de ROS pode levar a alterações permanentes da expressão genética (Valko *et al.*, 2007). A presença dos mastócitos poderá ser, pelo menos em parte, responsável pelo aumento da área do MLT e/ou da sua contractilidade, através da libertação de mediadores mastocitários como a triptase, a histamina ou a adenosina, para citar alguns exemplos (Page *et al.*, 2001) (Figura 26).

Para além do exposto, não se pode excluir a hipótese de que os resultados observados no final do período de recuperação se devam não directamente ao efeito persistente da hiperóxia neonatal,

mas ao facto de que a transição entre a hiperóxia e a normóxia possa ter actuado como uma “hipóxia relativa” sobre o músculo liso da traqueia. As repercussões da transição de um meio hiperóxico para o ar atmosférico em condições normobáricas sobre as vias aéreas, não foram ainda avaliadas por outros grupos (Figura 26).

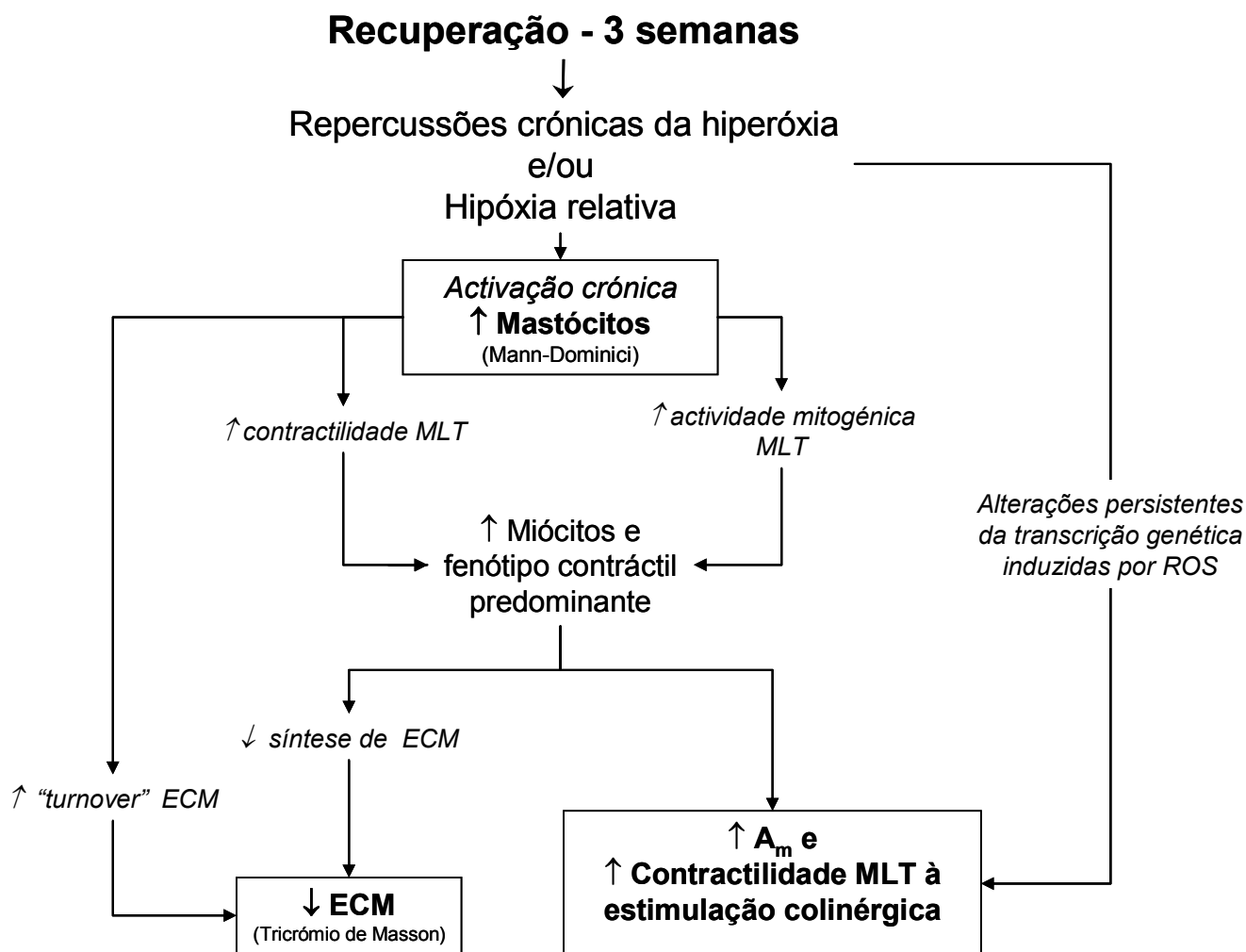


Figura 26 – Efeitos da recuperação após hiperóxia crónica. Após 3 semanas de recuperação em normóxia, a área de músculo liso (Am) manteve-se aumentada, bem como o número de mastócitos, que se encontravam em maior contiguidade com o músculo liso da traqueia (MLT) relativamente ao grupo 50%O₂, com aumento da resposta à estimulação colinérgica. Estes resultados podem ser atribuídos que à persistência de alterações induzidas pela hiperóxia como pelo retorno ao ar ambiente, actuando como “hipóxia relativa”.

Wilson e colaboradores avaliaram este efeito em ratos expostos a hiperóxia crónica subletal, mas exclusivamente sobre o múscu-

lo liso arterial pulmonar. Estes autores compararam a muscularização arterial e o número de artérias da circulação pulmonar de ratos expostos a 80%O₂ durante oito semanas, com a dos que voltaram para o ar ambiente após duas semanas de permanência naquelas condições (Wilson et al., 1985) e verificaram que a muscularização das artérias persistia em normóxia. Após quatro semanas de permanência em ar ambiente, as artérias musculares apresentavam maior hipertrofia da lâmina média (medida como percentagem do lúmen) que as dos animais que permaneceram em hiperóxia e, apesar de haver uma “recuperação” nas duas semanas seguintes, as artérias não adquiriram uma configuração idêntica à dos controlos. Os autores desenvolveram a hipótese de que o músculo exposto à hiperóxia a partir dos dez dias de vida reagia, ao voltar ao ar ambiente, como se se tratasse de uma “hipóxia relativa” (Wilson et al., 1985). Actualmente sabe-se que a hiperóxia pode induzir uma supressão temporária do factor endotelial de crescimento vascular (VEGF), mediada pela inibição do HIF (factor induzido pela hipóxia) pelo factor nuclear p53 (Das et al., 2004; Kamat et al., 2006), a que é atribuída o atraso na alveolarização durante a exposição a níveis elevados de oxigénio. Com o retorno a condições de normóxia, o VEGF aumenta, sendo considerado um dos responsáveis pela estimulação da angiogénese no período pós hiperóxico (D'Angio & Maniscalco, 2002; Horsford & Olson, 2003; Kamat et al., 2006).

No presente trabalho não se avaliou o efeito da exposição contínua à hiperóxia até aos 36 dias de vida, pelo que não se pode excluir que o retorno ao ar ambiente tenha estimulado a proliferação ou alterações da contractilidade do MLT, responsáveis pelo aumento da resposta à estimulação colinérgica, semelhantes às observadas na circulação pulmonar.

CONCLUSÃO

Apesar de os efeitos da hiperóxia sobre o parênquima pulmonar terem sido extensivamente avaliados por diferentes grupos, com o objectivo de compreender as repercussões da DBP, são menos conhecidas as repercussões da hiperóxia sobre as vias aéreas. Em particular, se a oxigenioterapia no período neonatal pode estar envolvida na patogénese da hiperreactividade brônquica que parte dos indivíduos apresenta, não só durante a fase aguda de exposição, como mais tarde, durante a infância e a adolescência. A utilização de **um modelo animal crónico representa um contributo útil, uma vez que não é possível isolar, em humanos, a hiperóxia como factor de risco num processo tão complexo como a lesão pulmonar do recém-nascido prematuro**, onde o *stress* oxidativo é considerado uma das vias comuns de lesão das vias aéreas (Saugstad, 2003; Saugstad, 2005).

Com o presente trabalho demonstrou-se que a hiperóxia neonatal crónica, em níveis moderados, induz alterações da resposta contráctil do MLT e da estrutura da traqueia que podem ter expressão funcional após a exposição ter cessado. Assim, o contributo original foi desenvolver um modelo animal que permite avaliar os mecanismos pelos quais a hiperóxia é capaz de induzir, isoladamente, **alterações persistentes** da contractilidade e do relaxamento do ML das vias aéreas.

Verificou-se que a hiperóxia é capaz de induzir alterações do relaxamento do MLT resultante da estimulação β_2 -adrenérgica. Com base no pressuposto de que a dose cumulativa máxima de metacolina pode ter induzido antagonismo funcional ao salbutamol, admite -se que as repercussões da hiperóxia sobre os receptores M_2 do MLT, que resultaram em maior sensibilidade e reactividade adrenérgica pelo MLT (maior relaxamento), que foram parcialmente reversíveis após a fase de recuperação em ar ambiente. Estes resultados terão,

contudo, de ser confirmados em preparações onde a contracção prévia à administração de salbutamol – indispensável para avaliar o relaxamento de ML das vias aéreas – seja induzida por doses submáximas de metacolina e através do bloqueio selectivo dos receptores M_2 do MLT. No caso de a hiperóxia moderada alterar esta via, será de esperar que o relaxamento não se modifique relativamente a controlos da mesma idade, quando os receptores M_2 forem bloqueados.

A hiperóxia moderada induziu um aumento, não significativo, da área de músculo que se manteve após o período de recuperação. Atendendo à variabilidade deste parâmetro, para se poderem tirar conclusões mais fiáveis sobre este aspecto será necessário medir a área de músculo num maior número de casos.

A avaliação qualitativa das alterações morfológicas foi sugestiva de que, **no período imediato à hiperóxia, a área medida possa ter sido sobrestimada pelo aumento da espessura do interstício**. Esta interpretação carece de melhor esclarecimento, mediante a marcação das proteínas contrácteis do músculo liso mediante técnicas de imunocitoquímica e aquisição da imagem por microscopia confocal (Martin & Ramos-Barbon, 2005), que permitirão avaliar se os resultados da morfometria nos dois grupos experimentais correspondem a “mais músculo” ou a “músculo diferente”.

Finalmente, uma vez que os mastócitos foram as células inflamatórias predominantes, tanto imediatamente após a exposição à hiperóxia como após o período de recuperação, esta alteração sugere que a estimulação crónica e persistente dos mastócitos possa ter um papel relevante na génese da HRB em doentes sujeitos a hiperóxia no período neonatal. Para além da confirmação destes dados por métodos quantitativos, será necessário avaliar o estado de activação destas células e a sua localização precisa relativamente ao músculo liso, para que este modelo animal possa ser considerado válido para

esclarecer o eventual papel destas células nas alterações da contratilidade do MLVA.

Tendo presente que um modelo animal não reproduz fielmente a patologia humana, mas permite por em evidência algumas das suas características, considera-se como contributo essencial do presente trabalho o desenvolvimento de um modelo em que se torna possível avaliar as repercussões crónicas da oxigenioterapia neonatal e o papel do músculo liso das vias aéreas e dos mastócitos na patogénese da HRB, resultante do *stress* oxidativo induzido por um estímulo inespecífico como o oxigénio.

BIBLIOGRAFIA

1. Adamko DJ, Fryer AD, Bochner BS, & Jacoby DB (2003). CD8+ T lymphocytes in viral hyperreactivity and M2 muscarinic receptor dysfunction. *Am J Respir Crit Care Med* 167, 550-556.
2. Adamko DJ, Yost BL, Gleich GJ, Fryer AD, & Jacoby DB (1999). Ovalbumin sensitization changes the inflammatory response to subsequent parainfluenza infection. Eosinophils mediate airway hyperresponsiveness, m(2) muscarinic receptor dysfunction, and antiviral effects. *J Exp Med* 190, 1465-1478.
3. Advenier C, Boissier JR, Ho S, Mallard B, & Ruff F (1978). The effects of pentobarbitone and urethane on pulmonary airway resistance in guinea-pigs and their interactions with drugs. *Br J Pharmacol* 64, 519-525.
4. Agani FH, Kuo NT, Chang CH, Dreshaj IA, Farver CF, Krause JE, Ernsberger P, Haxhiu MA, & Martin RJ (1997). Effect of hyperoxia on substance P expression and airway reactivity in the developing lung. *Am J Physiol* 273, L40-L45.
5. Ahrens P, Zielen S, Stover B, von L, V, & Hofmann D (1991). [Pulmonary sequelae of long-term ventilation of very low birth weight premature infants. Results of a follow-up study of 6-to-9-year-old children]. *Klin Padiatr* 203, 366-371.
6. Akers IA, Parsons M, Hill MR, Hollenberg MD, Sanjar S, Laurent GJ, & McAnulty RJ (2000). Mast cell tryptase stimulates human lung fibroblast proliferation via protease-activated receptor-2. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 278, L193-L201.
7. Albertine KH, Jones GP, Starcher BC, Bohnsack JF, Davis PL, Cho SC, Carlton DP, & Bland RD (1999). Chronic lung injury in preterm lambs. Disordered respiratory tract development. *Am J Respir Crit Care Med* 159, 945-958.
8. Amrani Y & Panettieri RA (2003). Airway smooth muscle: contraction and beyond. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 35, 272-276.
9. Amy RW, Bowes D, Burri PH, Haines J, & Thurlbeck WM (1977). Postnatal growth of the mouse lung (abstract). *J Anat* 124, 131-151.
10. Andreoli TE (2000). Free radicals and oxidative stress. *The American Journal of Medicine* 108, 650-651.
11. Appleby CJ & Towner RA (2001). Magnetic Resonance Imaging of Pulmonary Damage in the Term and Premature Rat Neonate Exposed to Hyperoxia. *Pediatr Res* 50, 502-507.
12. Arjamaa O & Nikinmaa M (2006). Oxygen-dependent diseases in the retina: role of hypoxia-inducible factors. *Exp Eye Res* 83, 473-483.
13. Asikainen TM, Heikkilä P, Kaarteenaho-Wiik R, Kinnula VL, & Raivio KO (2001). Cell-specific expression of manganese superoxide dismutase protein in the lungs of patients with respiratory distress syndrome, chronic

- lung disease, or persistent pulmonary hypertension. *Pediatr Pulmonol* 32, 193-200.
14. Asikainen TM, Schneider BK, Waleh NS, Clyman RI, Ho WB, Flippin LA, Gunzler V, & White CW (2005). Activation of hypoxia-inducible factors in hyperoxia through prolyl 4-hydroxylase blockade in cells and explants of primate lung. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 10212-10217.
 15. Asikainen TM & White CW (2005). Antioxidant defenses in the preterm lung: role for hypoxia-inducible factors in BPD? *Toxicol Appl Pharmacol* 203, 177-188.
 16. ATS (2003). Statement on the Care of the Child with Chronic Lung Disease of Infancy and Childhood. *Am J Respir Crit Care Med* 168, 356-396.
 17. Auten RL, Jr., Mason SN, Tanaka DT, Welty-Wolf K, & Whorton MH (2001). Anti-neutrophil chemokine preserves alveolar development in hyperoxia-exposed newborn rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 281, L336-L344.
 18. Auten RL, O'Reilly MA, Oury TD, Nozik-Grayck E, & Whorton MH (2005). Transgenic extracellular superoxide dismutase (EC-SOD) protects post-natal alveolar epithelial proliferation and development during hyperoxia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 00133.
 19. Auten RL, Richardson RM, White JR, Mason SN, Vozzelli MA, & Whorton MH (2001). Nonpeptide CXCR2 antagonist prevents neutrophil accumulation in hyperoxia-exposed newborn rats. *J Pharmacol Exp Ther* 299, 90-95.
 20. Babior BM (2000). Phagocytes and oxidative stress. *Am J Med* 109, 33-44.
 21. Baldrige CW & Gerard RW (1932). The extra respiration of phagocytosis. *Am J Physiol* 103, 235-236.
 22. Baldwin AS, Jr. (1996). The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 14, 649-683.
 23. Bancalari E, Claure N, & Sosenko IRS (2003). Bronchopulmonary dysplasia: changes in pathogenesis, epidemiology and definition. *Seminars in Neonatology* 8, 63-71.
 24. Barnes PJ & Karin M (1997). Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 336, 1066-1071.
 25. Barry BE & Crapo JD (1985). Patterns of accumulation of platelets and neutrophils in rat lungs during exposure to 100% and 85% oxygen. *Am Rev Respir Dis* 132, 548-555.
 26. Beckett WS & Wong ND (1988). Effect of normobaric hyperoxia on airways of normal subjects. *J Appl Physiol* 64, 1683-1687.
 27. Belcastro MR (2004). Bronchopulmonary dysplasia: A new look at an old problem. *Newborn and Infant Nursing Reviews* 4, 121-125.

28. Belik J, Jankov RP, Pan J, & Tanswell AK (2003). Chronic O₂ exposure enhances vascular and airway smooth muscle contraction in the newborn but not adult rat. *J Appl Physiol* 94, 2303-2312.
29. Belik J, Jankov RP, Pan J, Yi M, Chaudhry I, & Tanswell AK (2004). Chronic O₂ exposure in the newborn rat results in decreased pulmonary arterial nitric oxide release and altered smooth muscle response to isoprostane. *J Appl Physiol* 96, 725-730.
30. Belvisi MG, Ward JK, Mitchell JA, & Barnes PJ (1995). Nitric oxide as a neurotransmitter in human airways. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 329, 97-110.
31. Bhandari V (2003). The role of nitric oxide in hyperoxia-induced injury to the developing lung. *Front Biosci* 8, e361-e369.
32. Blackwell TS & Christman JW (1997). The role of nuclear factor-kappa B in cytokine gene regulation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 17, 3-9.
33. Boros V, Burghardt JS, Morgan CJ, & Olson DM (1997). Leukotrienes are indicated as mediators of hyperoxia-inhibited alveolarization in newborn rats. *Am J Physiol* 272, L433-L441.
34. Bourbon J, Boucherat O, Chailley-Heu B, & Delacourt C (2005). Control mechanisms of lung alveolar development and their disorders in bronchopulmonary dysplasia. *Pediatr Res* 57, 38R-46R.
35. Boyce JA (2003). Mast cells: beyond IgE. *J Allergy Clin Immunol* 111, 24-32.
36. Bradding P, Walls AF, & Holgate ST (2006). The role of the mast cell in the pathophysiology of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 117, 1277-1284.
37. Brightling CE & Bradding P (2005). The re-emergence of the mast cell as a pivotal cell in asthma pathogenesis. *Curr Allergy Asthma Rep* 5, 130-135.
38. Brightling CE, Bradding P, Symon FA, Holgate ST, Wardlaw AJ, & Pavord ID (2002). Mast-cell infiltration of airway smooth muscle in asthma. *N Engl J Med* 346, 1699-1705.
39. Brightling CE, Symon FA, Birring SS, Bradding P, Wardlaw AJ, & Pavord ID (2003). Comparison of airway immunopathology of eosinophilic bronchitis and asthma. *Thorax* 58, 528-532.
40. Brightling CE, Ward R, Goh KL, Wardlaw AJ, & Pavord ID (1999). Eosinophilic bronchitis is an important cause of chronic cough. *Am J Respir Crit Care Med* 160, 406-410.
41. Brock TG & Di GC (2006). Prolonged exposure to hyperoxia increases perivascular mast cells in rat lungs. *J Histochem Cytochem* 54, 1239-1246.
42. Broussard D, Larson JE, Cohen JC, & Lundblad LK (2006). Developmental changes in respiratory mechanics in the neonatal rat. *Exp Lung Res* 32, 263-273.

43. Brown JK, Jones CA, Rooney LA, & Caughey GH (2001). Mast cell tryptase activates extracellular-regulated kinases (p44/p42) in airway smooth-muscle cells: importance of proteolytic events, time course, and role in mediating mitogenesis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 24, 146-154.
44. Brown JK, Jones CA, Rooney LA, Caughey GH, & Hall IP (2002). Tryptase's potent mitogenic effects in human airway smooth muscle cells are via non-proteolytic actions. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 282, L197-L206.
45. Brown JK, Tyler CL, Jones CA, Ruoss SJ, Hartmann T, & Caughey GH (1995). Tryptase, the dominant secretory granular protein in human mast cells, is a potent mitogen for cultured dog tracheal smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 13, 227-236.
46. Brueckl C, Kaestle S, Kerem A, Habazettl H, Krombach F, Kuppe H, & Kuebler WM (2006). Hyperoxia-induced reactive oxygen species formation in pulmonary capillary endothelial cells in situ. *Am J Respir Cell Mol Biol* 34, 453-463.
47. Buckley S, Bui KC, Hussain M, & Warburton D (1996). Dynamics of TGF-beta 3 peptide activity during rat alveolar epithelial cell proliferative recovery from acute hyperoxia. *Am J Physiol* 271, L54-L60.
48. Burghardt JS, Boros V, Biggs DF, & Olson DM (1996). Lipid mediators in oxygen-induced airway remodeling and hyperresponsiveness in newborn rats. *Am J Respir Crit Care Med* 154, 837-842.
49. Burri PH (1984). Fetal and postnatal development of the lung. *Annu Rev Physiol* 46, 617-628.
50. Burri PH (2006). Structural aspects of postnatal lung development - alveolar formation and growth. *Biol Neonate* 89, 313-322.
51. Burri PH & Hislop AA (1998). Structural considerations. Early intervention in childhood asthma. *Eur Respir J Suppl* 27, 59s-65s.
52. Capellier G, Maupoil V, Boussat S, Laurent E, & Neidhardt A (1999). Oxygen toxicity and tolerance. *Minerva Anesthesiol* 65, 388-392.
53. Chang LY & Crapo JD (2002). Inhibition of airway inflammation and hyper-reactivity by an antioxidant mimetic. *Free Radic Biol Med* 33, 379-386.
54. Chang LY, Subramaniam M, Yoder BA, Day BJ, Ellison MC, Sunday ME, & Crapo JD (2003). A catalytic antioxidant attenuates alveolar structural remodeling in bronchopulmonary dysplasia. *Am J Respir Crit Care Med* 167, 57-64.
55. Chen Y, Martinez MA, & Frank L (1997). Prenatal dexamethasone administration to premature rats exposed to prolonged hyperoxia: A new rat model of pulmonary fibrosis (bronchopulmonary dysplasia), , . *The Journal of Pediatrics* 130, 409-416.
56. Chess PR, D'Angio CT, Pryhuber GS, & Maniscalco WM (2006). Pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia. *Semin Perinatol* 30, 171-178.

57. Chitano P & Murphy TM (2003). Maturational changes in airway smooth muscle shortening and relaxation. Implications for asthma. *Respir Physiol Neurobiol* 137, 347-359.
58. Chitano P, Worthington CL, Jenkin JA, Stephens NL, Gyapong S, Wang L, & Murphy TM (2005). Ontogenesis of myosin light chain phosphorylation in guinea pig tracheal smooth muscle. *Pediatr Pulmonol* 39, 108-116.
59. Chowdhury AK, Watkins T, Parinandi NL, Saatian B, Kleinberg ME, Usatyuk PV, & Natarajan V (2005). Src-mediated tyrosine phosphorylation of p47phox in hyperoxia-induced activation of NADPH oxidase and generation of reactive oxygen species in lung endothelial cells. *J Biol Chem* 280, 20700-20711.
60. Chung KF (2000). Airway smooth muscle cells: contributing to and regulating airway mucosal inflammation? *Eur Respir J* 15, 961-968.
61. Clayton RA, Nally JE, MacLean MR, Thomson NC, & McGrath JC (1999). Chronic exposure to hypoxia attenuates contractile responses in rat airways in vitro: a possible role for nitric oxide. *Eur J Pharmacol* 385, 29-37.
62. Clerch LB, Massaro D, & Berkovich A (1998). Molecular mechanisms of antioxidant enzyme expression in lung during exposure to and recovery from hyperoxia. *Am J Physiol* 274, L313-L319.
63. Coalson JJ, Kuehl TJ, Escobedo MB, Leonard HJ, Smith F, Meredith K, Null J, Walsh W, Johnson D, & Robotham JL (1982). A baboon model of bronchopulmonary dysplasia : II. Pathologic features. *Exp Mol Pathol* 37, 335-350.
64. Coalson JJ, Winter VT, Gerstmann DR, Idell S, King RJ, & deLemos RA (1992). Pathophysiologic, morphometric, and biochemical studies of the premature baboon with bronchopulmonary dysplasia. *Am Rev Respir Dis* 145, 872-881.
65. Coalson JJ, Winter VT, Siler-Khodr T, & Yoder BA (1999). Neonatal chronic lung disease in extremely immature baboons. *Am J Respir Crit Care Med* 160, 1333-1346.
66. Costello RW, Jacoby DB, & Fryer AD (1998). Pulmonary neuronal M2 muscarinic receptor function in asthma and animal models of hyperreactivity. *Thorax* 53, 613-618.
67. Costello RW, Jacoby DB, Gleich GJ, & Fryer AD (2000). Eosinophils and airway nerves in asthma. *Histol Histopathol* 15, 861-868.
68. Costello RW, Schofield BH, Kephart GM, Gleich GJ, Jacoby DB, & Fryer AD (1997). Localization of eosinophils to airway nerves and effect on neuronal M2 muscarinic receptor function. *Am J Physiol* 273, L93-103.
69. Coulson FR & Fryer AD (2003). Muscarinic acetylcholine receptors and airway diseases. *Pharmacol Ther* 98, 59-69.
70. Crapo JD (2003). Redox active agents in inflammatory lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 168, 1027-1028.

71. Crapo JD (1986). Morphological changes in pulmonary oxygen-toxicity. *Annu Rev Physiol* 48, 721-731.
72. Crapo JD (1975). Superoxide-dismutase and tolerance to pulmonary oxygen toxicity. *Chest* 67, S39-S40.
73. Crapo JD, Barry BE, Foscue HA, & Shelburne J (1980). Structural and biochemical changes in rat lungs occurring during exposures to lethal and adaptive doses of oxygen. *Am Rev Respir Dis* 122, 123-143.
74. Crapo JD, Hayatdavoudi G, Knapp MJ, Fracica PJ, Wolfe WG, & Piantadosi CA (1994). Progressive alveolar septal injury in primates exposed to 60% oxygen for 14 days. *Am J Physiol* 267, L797-L806.
75. D'Angio CT & Finkelstein JN (2000). Oxygen regulation of gene expression: a study in opposites. *Mol Genet Metab* 71, 371-380.
76. D'Angio CT, LoMonaco MB, Johnston CJ, Reed CK, & Finkelstein JN (2004). Differential roles for NF-kappa B in endotoxin and oxygen induction of interleukin-8 in the macrophage. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286, L30-L36.
77. D'Angio CT & Maniscalco WM (2002). The role of vascular growth factors in hyperoxia-induced injury to the developing lung. *Front Biosci* 7, d1609-d1623.
78. D'Angio CT & Maniscalco WM (2004). Bronchopulmonary dysplasia in pre-term infants: pathophysiology and management strategies. *Paediatr Drugs* 6, 303-330.
79. Das KC, Ravi D, & Holland W (2004). Increased apoptosis and expression of p21 and p53 in premature infant baboon model of bronchopulmonary dysplasia. *Antioxid Redox Signal* 6, 109-116.
80. Dauger S, Ferkdadjji L, Saumon G, Vardon G, Peuchmaur M, Gaultier C, & Gallego J (2003). Neonatal exposure to 65% oxygen durably impairs lung architecture and breathing pattern in adult mice. *Chest* 123, 530-538.
81. Degano B, Mourlanette P, Valmary S, Pontier S, Prevost MC, & Escamilla R (2003). Differential effects of low and high-dose estradiol on airway reactivity in ovariectomized rats. *Respir Physiol Neurobiol* 138, 265-274.
82. Degano B, Prevost MC, Berger P, Molimard M, Pontier S, Rami J, & Escamilla R (2001). Estradiol decreases the acetylcholine-elicited airway reactivity in ovariectomized rats through an increase in epithelial acetylcholinesterase activity. *Am J Respir Crit Care Med* 164, 1849-1854.
83. Demnati R, Fraser R, Ghezzi H, Martin JG, Plaa G, & Malo JL (1998). Time-course of functional and pathological changes after a single high acute inhalation of chlorine in rats. *Eur Respir J* 11, 922-928.
84. Deng H, Mason SN, & Auten RL, Jr. (2000). Lung inflammation in hyperoxia can be prevented by antichemokine treatment in newborn rats. *Am J Respir Crit Care Med* 162, 2316-2323.

85. Denis D, Fayon MJ, Berger P, Molimard M, De Lara MT, Roux E, & Marthan R (2001). Prolonged moderate hyperoxia induces hyperresponsiveness and airway inflammation in newborn rats. *Pediatr Res* 50, 515-519.
86. Doyle LW, Cheung MM, Ford GW, Olinsky A, Davis NM, & Callanan C (2001). Birth weight <1501 g and respiratory health at age 14. *Arch Dis Child* 84, 40-44.
87. Duguet A, Biyah K, Minshall E, Gomes R, Wang CG, Taoudi-Benchekroun M, Bates JH, & Eidelman DH (2000). Bronchial responsiveness among inbred mouse strains. Role of airway smooth-muscle shortening velocity. *Am J Respir Crit Care Med* 161, 839-848.
88. Ehlert FJ (2003a). Contractile role of M2 and M3 muscarinic receptors in gastrointestinal, airway and urinary bladder smooth muscle. *Life Sci* 74, 355-366.
89. Ehlert FJ (2003b). Pharmacological analysis of the contractile role of M2 and M3 muscarinic receptors in smooth muscle. *Receptors Channels* 9, 261-277.
90. El-Shazly A, Berger P, Girodet PO, Ousova O, Fayon M, Vernejoux JM, Marthan R, & Tunon-de-Lara JM (2006). Fraktalkine produced by airway smooth muscle cells contributes to mast cell recruitment in asthma. *J Immunol* 176, 1860-1868.
91. Elsasser S, Donna E, Demirozu CM, Danta I, & Wanner A (1996). Metaproterenol responsiveness after methacholine- and histamine-induced bronchoconstriction. *Chest* 110, 617-623.
92. Fayon M, Denis D, Molimard M, Berger P, Choukroun ML, Demarquez JL, Marthan R, Cleaveland H, Lachaud JL, Martinez B, & Techoueyres P (2002). Pharmacologically induced relaxation of tracheal smooth muscle is increased in hyperoxia-exposed 15-day-old rats. *Pediatr Pulmonol* 33, 124-129.
93. Fayon M, Ben-Jebria A, Elleau C, Carles D, Demarquez JL, Savineau JP, & Marthan R (1994). Human airway smooth muscle responsiveness in neonatal lung specimens. *Am J Physiol* 267, L180-L186.
94. Fayon M, Dumas De La RE, Berger P, Begueret H, Ousova O, Molimard M, & Marthan R (2004). Increased relaxation of immature airways to β_2 -adrenoceptor agonists is related to attenuated expression of postjunctional smooth muscle muscarinic M2 receptors. *J Appl Physiol* 98, 1526-1533.
95. Fernandes LB, Fryer AD, & Hirshman CA (1992). M2 muscarinic receptors inhibit isoproterenol-induced relaxation of canine airway smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* 262, 119-126.
96. Florio C, Styhler A, Heisler S, & Martin JG (1996). Mechanical responses of tracheal tissue in vitro: dependence on the tissue preparation employed and relationship to smooth muscle content. *Pulm Pharmacol* 9, 157-166.

97. Fracica PJ, Caminiti SP, Piantadosi CA, Duhaylongsod FG, Crapo JD, & Young SL (1994). Natural surfactant and hyperoxic lung injury in primates. II. Morphometric analyses. *J Appl Physiol* 76, 1002-1010.
98. Fracica PJ, Knapp MJ, Piantadosi CA, Takeda K, Fulkerson WJ, Coleman RE, Wolfe WG, & Crapo JD (1991). Responses of baboons to prolonged hyperoxia: physiology and qualitative pathology. *J Appl Physiol* 71, 2352-2362.
99. Frank L (1991). Developmental aspects of experimental pulmonary oxygen toxicity. *Free Radic Biol Med* 11, 463-494.
100. Frank L (2003). Protective effect of keratinocyte growth factor against lung abnormalities associated with hyperoxia in prematurely born rats. *Biol Neonate* 83, 263-272.
101. Frank L, Bucher JR, & Roberts RJ (1978). Oxygen toxicity in neonatal and adult animals of various species. *J Appl Physiol* 45, 699-704.
102. Freeman BA & Crapo JD (1981). Hyperoxia increases oxygen radical production in rat lungs and lung mitochondria. *J Biol Chem* 256, 10986-10992.
103. Freeman BA & Tanswell AK (1985). Biochemical and cellular aspects of pulmonary oxygen toxicity. *Advances in Free Radical Biology & Medicine* 1, 133-164.
104. Fridovich I (1998). Oxygen toxicity: a radical explanation. *J Exp Biol* 201, 1203-1209.
105. Fridovich I (1997). Superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$), superoxide dismutases, and related matters. *J Biol Chem* 272, 18515-18517.
106. Fridovich I (1986). Biological effects of the superoxide radical. *Arch Biochem Biophys* 247, 1-11.
107. Fridovich I & Freeman B (1986). Antioxidant defenses in the lung. *Annu Rev Physiol* 48, 693-702.
108. Friedrich L, Corso AL, & Jones MH (2005). [Pulmonary prognosis in preterm infants]. *J Pediatr (Rio J)* 81, S79-S88.
109. Frossard N & Landry Y (1985). Physiological approach of beta receptor coupling to adenylate cyclase in rat airways: ontogenical modification and functional antagonism. *J Pharmacol Exp Ther* 233, 168-175.
110. Fryer AD & Jacoby DB (1998). Muscarinic receptors and control of airway smooth muscle. *Am J Respir Crit Care Med* 158, S154-S160.
111. Fryer AD, Lein PJ, Howard AS, Yost BL, Beckles RA, & Jett DA (2004). Mechanisms of organophosphate insecticide-induced airway hyperreactivity. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286, L963-L969.
112. Gamboa T, Fernandes G, Ribeiro S, Correia M, & Rendas A (2005). [Effects of moderate chronic hyperoxia on airways of newborn rats.]. *Rev Port Pneumol* 11, 19.

113. Gerik SM, Keeney SE, Dallas DV, Palkowetz KH, & Schmalstieg FC (2003). Neutrophil adhesion molecule expression in the developing neonatal rat exposed to hyperoxia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 29, 506-512.
114. Gourgoulialis KI, Domali A, & Molyvdas PA (1999). Airway responsiveness: role of inflammation, epithelium damage and smooth muscle tension. *Mediators Inflamm* 8, 261-263.
115. Gunst SJ & Fredberg JJ (2003). The first three minutes: smooth muscle contraction, cytoskeletal events, and soft glasses. *J Appl Physiol* 95, 413-425.
116. Gurish MF & Boyce JA (2006). Mast cells: Ontogeny, homing, and recruitment of a unique innate effector cell. *J Allergy Clin Immunol* 117, 1285-1291.
117. Halayko AJ & Amrani Y (2003). Mechanisms of inflammation-mediated airway smooth muscle plasticity and airways remodeling in asthma. *Respir Physiol Neurobiol* 137, 209-222.
118. Halayko AJ, Tran T, Ji SY, Yamasaki A, & Gosens R (2006). Airway smooth muscle phenotype and function: interactions with current asthma therapies. *Curr Drug Targets* 7, 525-540.
119. Halliwell B (1991). Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *Am J Med* 91, 14S-22S.
120. Halliwell B (1994). Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet* 344, 721-724.
121. Halliwell B (1996). Free radicals, proteins and DNA: oxidative damage versus redox regulation. *Biochem Soc Trans* 24, 1023-1027.
122. Halliwell B, Zhao K, & Whiteman M (1999). Nitric oxide and peroxynitrite. The ugly, the uglier and the not so good: a personal view of recent controversies. *Free Radic Res* 31, 651-669.
123. Halvorsen T, Skadberg BT, Eide GE, Roksund O, Aksnes L, & Oymar K. (2005) Characteristics of asthma and airway hyper-responsiveness after premature birth. *Pediatr Allergy Immunol.* 16[6], 487-494.
124. Halvorsen T, Skadberg BT, Eide GE, Roksund OD, Carlsen KH, & Bakke P (2004). Pulmonary outcome in adolescents of extreme preterm birth: a regional cohort study. *Acta Paediatr* 93, 1294-1300.
125. Han RN, Buch S, Tseu I, Young J, Christie NA, Frndova H, Lye SJ, Post M, & Tanswell AK (1996). Changes in structure, mechanics, and insulin-like growth factor-related gene expression in the lungs of newborn rats exposed to air or 60% oxygen. *Pediatr Res* 39, 921-929.
126. Harling A, Beresford M, Vince G, Bates M, & Yoxall C (2005). Does the use of 50% oxygen at birth in preterm infants reduce lung injury? *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 90, F401-F405.

127. Henricks PA & Nijkamp FP (2001). Reactive oxygen species as mediators in asthma. *Pulm Pharmacol Ther* 14, 409-420.
128. Hershenson MB, Aghili S, Punjabi N, Hernandez C, Ray DW, Garland A, Glagov S, & Solway J (1992a). Hyperoxia-induced airway hyperresponsiveness and remodeling in immature rats. *Am J Physiol* 262, L263-L269.
129. Hershenson MB, Garland A, Kelleher MD, Zimmermann A, Hernandez C, & Solway J (1992b). Hyperoxia-induced airway remodeling in immature rats. Correlation with airway responsiveness. *Am Rev Respir Dis* 146, 1294-1300.
130. Hershenson MB, Abe MK, Kelleher MD, Naureckas ET, Garland A, Zimmermann A, Rubinstein VJ, & Solway J (1994a). Recovery of airway structure and function after hyperoxic exposure in immature rats. *Am J Respir Crit Care Med* 149, 1663-1669.
131. Hershenson MB, Kelleher MD, Naureckas ET, Abe MK, Rubinstein VJ, Zimmermann A, Bendele AM, McNulty JA, Panettieri RA, & Solway J (1994b). Hyperoxia increases airway cell S-phase traversal in immature rats in vivo. *Am J Respir Cell Mol Biol* 11, 296-303.
132. Hershenson MB, Wylam ME, Punjabi N, Umans JG, Schumacker PT, Mitchell RW, & Solway J (1994c). Exposure of immature rats to hyperoxia increases tracheal smooth muscle stress generation in vitro. *J Appl Physiol* 76, 743-749.
133. Hesse AK, Dorger M, Kupatt C, & Krombach F (2004). Proinflammatory role of inducible nitric oxide synthase in acute hyperoxic lung injury. *Respir Res* 5, 11.
134. Hirst SJ, Martin JG, Bonacci JV, Chan V, Fixman ED, Hamid QA, Herszberg B, Lavoie JP, McVicker CG, Moir LM, Nguyen TTB, Peng Q, Ramos-Barbon D, & Stewart AG (2004). Proliferative aspects of airway smooth muscle. *J Allergy Clin Immunol* 114, S2-S17.
135. Hislop AA (2002). Airway and blood vessel interaction during lung development. *J Anat* 201, 325-334.
136. Holland JA, Pritchard KA, Pappolla MA, Wolin MS, Rogers NJ, & Stemerman MB (1990). Bradykinin induces superoxide anion release from human endothelial cells. *J Cell Physiol* 143, 21-25.
137. Hopp RJ, Bewtra A, Nair NM, & Townley RG (1985). The effect of age on methacholine response. *J Allergy Clin Immunol* 76, 609-613.
138. Hosford GE, Fang X, & Olson DM (2004). Hyperoxia decreases matrix metalloproteinase-9 and increases tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 protein in the newborn rat lung: association with arrested alveolarization. *Pediatr Res* 56, 26-34.
139. Hosford GE & Olson DM (2003). Effects of hyperoxia on VEGF, its receptors, and HIF-2{alpha} in the newborn rat lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285, L161-L168.

140. Howarth PH, Knox AJ, Amrani Y, Tliba O, Panettieri RA, Jr., & Johnson M (2004). Synthetic responses in airway smooth muscle. *J Allergy Clin Immunol* 114, S32-S50.
141. Iben SC, Dreshaj IA, Farver CF, Haxhiu MA, & Martin RJ (2000a). Role of endogenous nitric oxide in hyperoxia-induced airway hyperreactivity in maturing rats. *J Appl Physiol* 89, 1205-1212.
142. Iyer GY, NAIR MS, & Sukumaran M (1961). Metabolic effects of alpha-oxobutyric acid: effect on respiration of rat-liver homogenates. *Biochem J* 78, 766-769.
143. Jacoby DB, Xiao HQ, Lee NH, Chan-Li Y, & Fryer AD (1998). Virus- and interferon-induced loss of inhibitory M2 muscarinic receptor function and gene expression in cultured airway parasympathetic neurons. *J Clin Invest* 102, 242-248.
144. James A & Carrol N (2000). Airway smooth muscle in health and disease; methods of measurement and relation to function. *Eur Respir J* 15, 782-789.
145. Jamieson D, Chance B, Cadenas E, & Boveris A (1986). The relation of free-radical production to hyperoxia. *Annu Rev Physiol* 48, 703-719.
146. Jany B, Betz R, & Schreck R (1995). Activation of the transcription factor NF-kappa B in human tracheobronchial epithelial cells by inflammatory stimuli. *Eur Respir J* 8, 387-391.
147. Jeffery PK (1998). The development of large and small airways. *Am J Respir Crit Care Med* 157, 174S-180.
148. Johnston CJ, Stripp BR, Piedbeouf B, Wright TW, Mango GW, Reed CK, & Finkelstein JN (1998). Inflammatory and epithelial responses in mouse strains that differ in sensitivity to hyperoxic injury. *Exp Lung Res* 24, 189-202.
149. Kamat CD, Green DE, Warnke L, Thorpe JE, Ceriello A, & Ihnat MA (2006). Mutant p53 facilitates pro-angiogenic, hyperproliferative phenotype in response to chronic relative hypoxia; aceite para publicação em doi:10.1016/j.canlet.2006.08.017. *Cancer Lett* xxx.
150. Keeney SE, Mathews MJ, Haque AK, & Schmalstieg FC (1995). Comparison of pulmonary neutrophils in the adult and neonatal rat after hyperoxia. *Pediatr Res* 38, 857-863.
151. Kennedy JD, David JB, Martin AJ, Silvia ND, Ross RH, Andrew JM, Rima E. Staugas, & Peter B (2000). Effects of birthweight and oxygen supplementation on lung function in late childhood in children of very low birth weight. *Pediatr Pulmonol* 30, 32-40.
152. Keyer K, Gort AS, & Imlay JA (1995). Superoxide and the production of oxidative DNA damage. *J Bacteriol* 177, 6782-6790.
153. Keyer K & Imlay JA (1996). Superoxide accelerates DNA damage by elevating free-iron levels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 13635-13640.

154. Kinnula VL (2005). Production and degradation of oxygen metabolites during inflammatory states in the human lung. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 4, 465-470.
155. Kinnula VL, Chang LY, Ho YS, & Crapo JD (1992). Hydrogen peroxide release from alveolar macrophages and alveolar type II cells during adaptation to hyperoxia in vivo. *Exp Lung Res* 18, 655-673.
156. Kinnula VL & Crapo JD (2003). Superoxide Dismutases in the Lung and Human Lung Diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 167, 1600-1619.
157. Kinnula VL, Crapo JD, & Raivio KO (1995). Generation and disposal of reactive oxygen metabolites in the lung. *Lab Invest* 73, 3-19.
158. Kinnula VL, Everitt JI, Whorton AR, & Crapo JD (1991). Hydrogen peroxide production by alveolar type II cells, alveolar macrophages, and endothelial cells. *Am J Physiol* 261, L84-L91.
159. Koumbourlis AC, Motoyama EK, Mutich RL, Mallory GB, Walczak SA, & Fertal K (1996). Longitudinal follow-up of lung function from childhood to adolescence in prematurely born patients with neonatal chronic lung disease. *Pediatr Pulmonol* 21, 28-34.
160. Kraneveld A, van der Kleij H, Kool M, van Houwelingen A, Weitenberg A, Redegeld F, & Nijkamp F (2002). Key role for mast cells in nonatopic asthma. *J Immunol* 169, 2044-2053.
161. Kuo KH, Herrera AM, Wang L, Pare PD, Ford LE, Stephens NL, & Seow CY (2003). Structure-function correlation in airway smooth muscle adapted to different lengths. *Am J Physiol Cell Physiol* 285, C384-C390.
162. Kuo KH, Wang L, Pare PD, Ford LE, & Seow CY (2001). Myosin thick filament lability induced by mechanical strain in airway smooth muscle. *J Appl Physiol* 90, 1811-1816.
163. Laudert S, Thibeault D, Rezaiekhalegh M, Mabry S, & Huntrakoon M (1994). Comparative age-related acute and chronic pulmonary oxygen tolerance in rats. *J Appl Physiol* 77, 2709-2719.
164. Lee AM, Fryer AD, van RN, & Jacoby DB (2004). Role of macrophages in virus-induced airway hyperresponsiveness and neuronal M2 muscarinic receptor dysfunction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286, L1255-L1259.
165. Lee PJ & Choi AM (2003). Pathways of cell signaling in hyperoxia. *Free Radic Biol Med* 35, 341-350.
166. Lein PJ & Fryer AD (2005). Organophosphorus insecticides induce airway hyperreactivity by decreasing neuronal M2 muscarinic receptor function independent of acetylcholinesterase inhibition. *Toxicol Sci* 83, 166-176.
167. Low RB & White SL (1998). Lung smooth muscle differentiation. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 30, 869-883.

168. Lyle RE, Tryka AF, Griffin WS, & Taylor BJ (1995). Tryptase immunoreactive mast cell hyperplasia in bronchopulmonary dysplasia. *Pediatr Pulmonol* 19, 336-343.
169. Mai XM, Gaddlin PO, Nilsson L, Finnstrom O, Bjorksten B, Jenmalm MC, & Leijon I (2003). Asthma, lung function and allergy in 12-year-old children with very low birth weight: a prospective study. *Pediatr Allergy Immunol* 14, 184-192.
170. Mantell LL, Horowitz S, Davis JM, & Kazzaz JA (1999). Hyperoxia-induced cell death in the lung--the correlation of apoptosis, necrosis, and inflammation. *Ann N Y Acad Sci* 887, 171-180.
171. Mantell LL & Lee PJ (2000). Signal transduction pathways in hyperoxia-induced lung cell death. *Mol Genet Metab* 71, 359-370.
172. Margraf LR, Tomashefski JF, Jr., Bruce MC, & Dahms BB (1991). Morphometric analysis of the lung in bronchopulmonary dysplasia. *Am Rev Respir Dis* 143, 391-400.
173. Martin EL, McCaig LA, Moyer BZ, Pape MC, Leco KJ, Lewis JF, & Veldhuizen RA (2005). Differential response of TIMP-3 null mice to the lung insults of sepsis, mechanical ventilation, and hyperoxia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 289, L244-L251.
174. Martin JG, Duguet A, & Eidelman DH (2000). The contribution of airway smooth muscle to airway narrowing and airway hyperresponsiveness in disease. *Eur Respir J* 16, 349-354.
175. Martin JG & Ramos-Barbon D (2005). Airway smooth muscle growth from the perspective of animal models. *Respir Physiol Neurobiol* 137, 251-261.
176. Mayo MW, Norris JL, & Baldwin AS (2001). Ras regulation of NF-kappa B and apoptosis. *Methods Enzymol* 333, 73-87.
177. McGowan S, Smith J, Holmes A, Smith L, Businga T, Madsen M, Kopp U, & Kline J (2002). Vitamin A deficiency promotes bronchial hyperreactivity in rats by altering muscarinic M2 receptor function. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 282, L1031-L1039.
178. Mhanna MJ, Haxhiu MA, Jaber MA, Walenga RW, Chang CH, Liu S, & Martin RJ (2004). Hyperoxia impairs airway relaxation in immature rats via a cAMP-mediated mechanism. *J Appl Physiol* 96, 1854-1860.
179. Minette PA, Lammers JW, Dixon CM, McCusker MT, & Barnes PJ (1989). A muscarinic agonist inhibits reflex bronchoconstriction in normal but not in asthmatic subjects. *J Appl Physiol* 67, 2461-2465.
180. Mitchell RW, Kelly E, & Leff AR (1991). Effect of in vitro preconditioning on tracheal smooth muscle responsiveness. *Am J Physiol* 260, L168-L173.
181. Murphy TM, Mitchell RW, Halayko A, Roach J, Roy L, Kelly EA, Munoz NM, Stephens NL, & Leff AR (1991a). Effect of maturational changes in myosin content and morphometry on airway smooth muscle contraction. *Am J Physiol* 260, L471-L480.

182. Murphy TM, Roy L, Phillips IJ, Mitchell RW, Kelly EA, Munoz NM, & Leff AR (1991b). Effect of maturation on topographic distribution of bronchoconstrictor responses in large diameter airways of young swine. *Am Rev Respir Dis* 143, 126-131.
183. Naureckas ET, Hershenson MB, Abe MK, Kelleher MD, Florio C, Heisler SI, Absher M, Evans JN, Samsel RW, & Solway J (1995). Bronchoalveolar lavage fluid from immature rats with hyperoxia-induced airway remodeling is mitogenic for airway smooth muscle. *Am J Respir Cell Mol Biol* 12, 268-274.
184. Ng D, Lau W, & Lee S (2000). Pulmonary sequelae in long-term survivors of bronchopulmonary dysplasia. *Pediatr Int* 42, 603-607.
185. NIH. National Institutes of Health. National Heart, Lung, and Blood Institute. Global Initiative for Asthma. Global strategy for asthma management and prevention. NIH Publication No.02-3659 , 1-200. 2005. Ref Type: Electronic Citation
186. Nishio K, Suzuki Y, Aoki T, Suzuki K, Miyata A, Sato N, Naoki K, Kudo H, Tsumura H, Serizawa H, Morooka S, Ishimura Y, Suematsu M, & Yamaguchi K (1998). Differential contribution of various adhesion molecules to leukocyte kinetics in pulmonary microvessels of hyperoxia-exposed rat lungs. *Am J Respir Crit Care Med* 157, 599-609.
187. Northway WH, Jr., Moss RB, Carlisle KB, Parker BR, Popp RL, Pitlick PT, Eichler I, Lamm RL, & Brown BW, Jr. (1990). Late pulmonary sequelae of bronchopulmonary dysplasia. *N Engl J Med* 323, 1793-1799.
188. Okamoto H, Prestwich SA, Asai S, Unno T, Bolton TB, & Komori S (2002). Muscarinic agonist potencies at three different effector systems linked to the M(2) or M(3) receptor in longitudinal smooth muscle of guinea-pig small intestine. *Br J Pharmacol* 135, 1765-1775.
189. Okayama Y, Okumura S, Yamashita N, Ohta K, & Saito H (2006). Mast cell-mediated airway remodelling. *Clinical & Experimental Allergy Reviews* 6, 80-84.
190. Page S, Ammit AJ, Black JL, & Armour CL (2001). Human mast cell and airway smooth muscle cell interactions: implications for asthma. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 281, L1313-L1323.
191. Pandya HC, Snetkov VA, Twort CHC, Ward JPT, & Hirst SJ (2002). Oxygen regulates mitogen-stimulated proliferation of fetal human airway smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283, L1220-L1230.
192. Panitch HB, Allen JL, Ryan JP, Wolfson MR, & Shaffer TH (1989). A comparison of preterm and adult airway smooth muscle mechanics. *J Appl Physiol* 66, 1760-1765.
193. Pappas CT, Obara H, Bensch KG, & Northway WH, Jr. (1983). Effect of prolonged exposure to 80% oxygen on the lung of the newborn mouse. *Lab Invest* 48, 735-748.
194. Pardo A, Barrios R, Maldonado V, Melendez J, Perez J, Ruiz V, Segura-Valdez L, Sznajder JI, & Selmán M (1998). Gelatinases A and B are up-

- regulated in rat lungs by subacute hyperoxia: pathogenetic implications. *Am J Pathol* 153, 833-844.
195. Parinandi NL, Kleinberg MA, Usatyuk PV, Cummings RJ, Pennathur A, Cardounel AJ, Zweier JL, Garcia JG, & Natarajan V (2003). Hyperoxia-induced NAD(P)H oxidase activation and regulation by MAP kinases in human lung endothelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 284, L26-L38.
 196. Pelkonen AS, Hakulinen AL, & Turpeinen M (1997). Bronchial lability and responsiveness in school children born very preterm. *Am J Respir Crit Care Med* 156, 1178-1184.
 197. Perkowski S, Scherpereel A, Murciano JC, Arguiri E, Solomides CC, Albelda SM, Muzykantov V, & Christofidou-Solomidou M (2006). Dissociation between alveolar transmigration of neutrophils and lung injury in hyperoxia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 291, L1050-L1058.
 198. Pietarinen-Runtti P, Raivio KO, Saksela M, Asikainen TM, & Kinnula VL (1998). Antioxidant enzyme regulation and resistance to oxidants of human bronchial epithelial cells cultured under hyperoxic conditions. *Am J Respir Cell Mol Biol* 19, 286-292.
 199. Pratusевич VR, Seow CY, & Ford LE (1995). Plasticity in canine airway smooth muscle. *J Gen Physiol* 105, 73-94.
 200. Preuss JM & Goldie RG (1999). Age-related changes in muscarinic cholinergic receptor function in guinea-pig and rat airway. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 360, 179-186.
 201. Preuss JM, Rigby PJ, & Goldie RG (1998). Age and region-dependent contraction to alpha-adrenoceptor agonists in rat and guinea-pig isolated trachea. *Br J Pharmacol* 123, 1541-1548.
 202. Preuss JM, Rigby PJ, & Goldie RG (1999). The influence of animal age on beta-adrenoceptor density and function in tracheal airway smooth muscle. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 360, 171-178.
 203. Proskocil BJ & Fryer AD (2005). Beta2-agonist and anticholinergic drugs in the treatment of lung disease. *Proc Am Thorac Soc* 2, 305-310.
 204. Racke K & Matthiesen S (2004). The airway cholinergic system: physiology and pharmacology. *Pulm Pharmacol Ther* 17, 181-198.
 205. Rahman I (2003). Oxidative stress, chromatin remodeling and gene transcription in inflammation and chronic lung diseases. *J Biochem Mol Biol* 36, 95-109.
 206. Rahman I (2000). Regulation of nuclear factor-kappa B, activator protein-1, and glutathione levels by tumor necrosis factor-alpha and dexamethasone in alveolar epithelial cells. *Biochem Pharmacol* 60, 1041-1049.
 207. Rahman I, Biswas SK, & Kode A (2006). Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. *Eur J Pharmacol* 533, 222-239.

208. Rahman I & Macnee W (1999). Lung glutathione and oxidative stress: implications in cigarette smoke-induced airway disease. *Am J Physiol* 277, L1067-L1088.
209. Rahman I & Macnee W (1996). Role of oxidants/antioxidants in smoking-induced lung diseases. *Free Radic Biol Med* 21, 669-681.
210. Ramchandani R, Shen X, Elmsley CL, Ambrosius WT, Gunst SJ, & Tepper RS (2000). Differences in airway structure in immature and mature rabbits. *J Appl Physiol* 89, 1310-1316.
211. Randell SH, Mercer RR, & Young SL (1990). Neonatal hyperoxia alters the pulmonary alveolar and capillary structure of 40-day-old rats. *Am J Pathol* 136, 1259-1266.
212. Romashko J, Horowitz S, Franek WR, Palaia T, Miller EJ, Lin A, Birrer MJ, Scott W, & Mantell LL (2003). MAPK pathways mediate hyperoxia-induced oncotic cell death in lung epithelial cells. *Free Radic Biol Med* 35, 978-993.
213. Roux E, Molimard M, Savineau JP, & Marthan R (1998). Muscarinic stimulation of airway smooth muscle cells. *Gen Pharmacol* 31, 349-356.
214. Sadeghi-Hashjin G, Folkerts G, Henricks PA, Muijsers RB, & Nijkamp FP (1998a). Peroxynitrite in airway diseases. *Clin Exp Allergy* 28, 1464-1473.
215. Sadeghi-Hashjin G, Henricks PA, Folkerts G, Muis T, Garssen J, & Nijkamp FP (1998b). Role of the epithelial layer in the generation of superoxide anion by the guinea-pig isolated trachea. *Mediators Inflamm* 7, 35-40.
216. Sadikot RT, Christman JW, & Blackwell TS (2004). Molecular targets for modulating lung inflammation and injury. *Curr Drug Targets* 5, 581-588.
217. Sadikot RT, Han W, Everhart MB, Zoia O, Peebles RS, Jansen ED, Yull FE, Christman JW, & Blackwell TS (2003). Selective I kappa B kinase expression in airway epithelium generates neutrophilic lung inflammation. *J Immunol* 170, 1091-1098.
218. Saugstad OD (2005). Oxidative stress in the newborn--a 30-year perspective. *Biol Neonate* 88, 228-236.
219. Saugstad OD (2003). Bronchopulmonary dysplasia-oxidative stress and antioxidants. *Semin Neonatol* 8, 39-49.
220. Saugstad OD (2001a). Update on oxygen radical disease in neonatology. *Curr Opin Obstet Gynecol* 13, 147-153.
221. Saugstad OD (2001b). Chronic lung disease: oxygen dogma revisited. *Acta Paediatr* 90, 113-115.
222. Saugstad OD (1996). Mechanisms of tissue injury by oxygen radicals: implications for neonatal disease. *Acta Paediatr* 85, 1-4.

223. Saugstad OD (1985). Oxygen radicals and pulmonary damage. *Pediatr Pulmonol* 1, 167-175.
224. Saugstad OD (1989). The oxygen radical disease in neonatology. *Indian J Pediatr* 56, 585-593.
225. Sbarra AJ & Karnovsky ML (1959). The Biochemical Basis of Phagocytosis. I. Metabolic changes during the ingestion of particles by polymorphonuclear leukocytes. *J Biol Chem* 234, 1355-1362.
226. Schittny JC, Miserocchi G, & Sparrow MP (2000). Spontaneous peristaltic airway contractions propel lung liquid through the bronchial tree of intact and fetal lung explants. *Am J Respir Cell Mol Biol* 23, 11-18.
227. Schultheis AH, Bassett DJ, & Fryer AD (1994). Ozone-induced airway hyperresponsiveness and loss of neuronal M2 muscarinic receptor function. *J Appl Physiol* 76, 1088-1097.
228. Scichilone N & Togias A (2004). The role of lung inflation in airway hyperresponsiveness and in asthma. *Curr Allergy Asthma Rep* 4, 166-174.
229. Shea LM, Beehler C, Schwartz M, Shenkar R, Tudor R, & Abraham E (1996). Hyperoxia activates NF-kappaB and increases TNF-alpha and IFN-gamma gene expression in mouse pulmonary lymphocytes. *J Immunol* 157, 3902-3908.
230. Shenberger JS, Shew RL, & Johnson DE (1997). Hyperoxia-induced airway remodeling and pulmonary neuroendocrine cell hyperplasia in the weanling rat. 8. *Pediatr Res* 42, 539-544.
231. Sies H (1991). Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med* 91, 31S-38S.
232. Sies H (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol* 82, 291-295.
233. Silva CA, Reber L, & Frossard N (2006). Stem cell factor expression, mast cells and inflammation in asthma. *Fundam Clin Pharmacol* 20, 21-39.
234. Sim AT, Ludowyke RI, & Verrills NM (2006). Mast cell function: regulation of degranulation by serine/threonine phosphatases. *Pharmacol Ther* 112, 425-439.
235. Simard B, Turcotte H, Cockcroft DW, Davis BE, Boulay ME, & Boulet LP (2005). Deep inspiration avoidance and methacholine response in normal subjects and patients with asthma. *Chest* 127, 135-142.
236. Smith LE (2004). Pathogenesis of retinopathy of prematurity. *Growth Horm IGF Res* 14 Suppl A, S140-S144.
237. Smith LE (2005). IGF-1 and retinopathy of prematurity in the preterm infant. *Biol Neonate* 88, 237-244.

238. Snepvangers Y, Peter de Winter JP, Burger H, Brouwers H, & Van der Ent CK (2004). Neonatal respiratory mechanics and development of bronchial hyperresponsiveness in preterm infants. *Early Hum Dev* 78, 105-118.
239. Solway J & Hershenson MB (1995). Structural and functional abnormalities of the airways of hyperoxia-exposed immature rats. *Chest* 107, 89S-93S.
240. Somlyo AP & Somlyo AV (1994). Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature* 372, 231-236.
241. Sparrow D, O'Connor G, Colton T, Barry CL, & Weiss ST (1987). The relationship of nonspecific bronchial responsiveness to the occurrence of respiratory symptoms and decreased levels of pulmonary function. The Normative Aging Study. *Am Rev Respir Dis* 135, 1255-1260.
242. Sparrow MP & Lamb JP (2003). Ontogeny of airway smooth muscle: structure, innervation, myogenesis and function in the fetal lung. *Respiratory Physiology & Neurobiology* 137, 361-372.
243. Sparrow MP & Mitchell HW (1990). Contraction of smooth muscle of pig airway tissues from before birth to maturity. *J Appl Physiol* 68, 468-477.
244. Sue RD, Belperio JA, Burdick MD, Murray LA, Xue YY, Dy MC, Kwon JJ, Keane MP, & Strieter RM (2004). CXCR2 is critical to hyperoxia-induced lung injury. *J Immunol* 172, 3860-3868.
245. Sukkar MB, Stanley AJ, Blake AE, Hodgkin PD, Johnson PR, Armour CL, & Hughes JM (2004). 'Proliferative' and 'synthetic' airway smooth muscle cells are overlapping populations. *Immunol Cell Biol* 82, 471-478.
246. Sunday ME, Shan L, & Subramaniam M (2004). Immunomodulatory functions of the diffuse neuroendocrine system: implications for bronchopulmonary dysplasia. *Endocr Pathol* 15, 91-106.
247. Sward-Comunelli SL, Mabry SM, Truog WE, & Thibeault DW (1997). Airway muscle in preterm infants: changes during development. *J Pediatr* 130, 570-576.
248. Szarek JL (1989). In vivo exposure to hyperoxia increases airway responsiveness in rats. Demonstration in vivo and in vitro. *Am Rev Respir Dis* 140, 942-947.
249. Szarek JL, Ramsay HL, Andringa A, & Miller ML (1995). Time course of airway hyperresponsiveness and remodeling induced by hyperoxia in rats. *Am J Physiol* 269, L227-L233.
250. Thangam EB, Venkatesha RT, Zaidi AK, Jordan-Sciutto KL, Goncharov DA, Krymskaya VP, Amrani Y, Panettieri J, & Ali H (2005). Airway smooth muscle cells enhance C3a-induced mast cell degranulation following cell-cell contact. *The FASEB Journal* 04-2797fje.
251. Tollet J, Everett AW, & Sparrow MP (2001). Spatial and temporal distribution of nerves, ganglia, and smooth muscle during the early pseudoglandular stage of fetal mouse lung development. *Dev Dyn* 221, 48-60.

252. Usatyuk PV, Vepa S, Watkins T, He D, Parinandi NL, & Natarajan V (2003). Redox regulation of reactive oxygen species-induced p38 MAP kinase activation and barrier dysfunction in lung microvascular endothelial cells. *Antioxid Redox Signal* 5, 723-730.
253. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, & Telser J (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39, 44-84.
254. Van de Voorde & Joos G (1998). Regionally different influence of contractile agonists on isolated rat airway segments. *Respir Physiol* 112, 185-194.
255. Van der Ent CK, Brackel HJ, van der LJ, & Bogaard JM (1996). Tidal breathing analysis as a measure of airway obstruction in children three years of age and older. *Am J Respir Crit Care Med* 153, 1253-1258.
256. Van der Vliet A & Cross CE (2000). Oxidants, nitrosants, and the lung. *The American Journal of Medicine* 109, 398-421.
257. Van Marter LJ (2005). Strategies for preventing bronchopulmonary dysplasia. *Curr Opin Pediatr* 17, 174-180.
258. Wagenaar GT, ter Horst SA, van Gastelen MA, Leijser LM, Mauad T, van d, V, de HE, Hiemstra PS, Poorthuis BJ, & Walther FJ (2004). Gene expression profile and histopathology of experimental bronchopulmonary dysplasia induced by prolonged oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 36, 782-801.
259. Walker JK, Gainetdinov RR, Feldman DS, McFawn PK, Caron MG, Lefkowitz RJ, Premont RT, & Fisher JT (2004). G protein-coupled receptor kinase 5 regulates airway responses induced by muscarinic receptor activation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286, L312-L319.
260. Walther FJ, Gidding CE, Kuipers IM, Willebrand D, Bevers EM, Abuchowski A, & Viau AT (1986). Prevention of oxygen toxicity with superoxide dismutase and catalase in premature lambs. *Journal of Free Radicals in Biology & Medicine* 2, 289-293.
261. Wang L, Chitano P, & Murphy TM (2005). A maturational model for the study of airway smooth muscle adaptation to mechanical oscillation. *Can J Physiol Pharmacol* 83, 817.
262. Warner BB, Stuart LA, Papes RA, & Wispe JR (1998). Functional and pathological effects of prolonged hyperoxia in neonatal mice. *Am J Physiol* 275, L110-L117.
263. Welty SE, Rivera JL, Elliston JF, Smith CV, Zeb T, Ballantyne CM, Montgomery CA, & Hansen TN (1993). Increases in lung tissue expression of intercellular adhesion molecule-1 are associated with hyperoxic lung injury and inflammation in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 9, 393-400.
264. Werdich XQ, McCollum GW, Rajaratnam VS, & Penn JS (2004). Variable oxygen and retinal VEGF levels: correlation with incidence and severity of pathology in a rat model of oxygen-induced retinopathy. *Exp Eye Res* 79, 623-630.

265. Wilborn AM, Evers LB, & Canada AT (1996). Oxygen toxicity to the developing lung of the mouse: role of reactive oxygen species. *Pediatr Res* 40, 225-232.
266. Wilson WL, Mullen M, Olley PM, & Rabinovitch M (1985). Hyperoxia-induced pulmonary vascular and lung abnormalities in young rats and potential for recovery. *Pediatr Res* 19, 1059-1067.
267. Wolfe WG & DeVries WC (1975). Oxygen toxicity. *Annu Rev Med* 26, 203-217.
268. Yam J, Frank L, & Roberts RJ (1978). Oxygen toxicity: comparison of lung biochemical responses in neonatal and adult rats. *Pediatr Res* 12, 115-119.
269. Yang Y, Palmer KC, Relan N, Diglio C, & Schuger L (1998). Role of laminin polymerization at the epithelial mesenchymal interface in bronchial myogenesis. *Development* 125, 2621-2629.
270. Yi M, Jankov RP, Belcastro R, Humes D, Copland I, Shek S, Sweezey NB, Post M, Albertine KH, Auten RL, & Tanswell AK (2004). Opposing effects of 60% oxygen and neutrophil influx on alveologenesis in the neonatal rat. *Am J Respir Crit Care Med* 170, 1188-1196.
271. Zapatero-Caballero H, Sanchez-Franco F, Fernandez-Mendez C, Garcia-San FM, Botella-Cubells LM, & Fernandez-Vazquez G (2004). Gonadotropin-releasing hormone receptor gene expression during pubertal development of female rats. *Biol Reprod* 70, 348-355.
272. Zapatero-Caballero H, Sanchez-Franco F, Guerra-Perez N, Fernandez-Mendez C, & Fernandez-Vazquez G (2003). Gonadotropin-releasing hormone receptor gene expression during pubertal development of male rats. *Biol Reprod* 68, 1764-1770.
273. Zeb T, Piedboeuf B, Gamache M, Langston C, & Welty SE (1996). P-selectin is upregulated early in the course of hyperoxic lung injury in mice. *Free Radic Biol Med* 21, 567-574.